

ISSN-2007-8080

REVISTA MEXICANA DE
FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

VOLUMEN 33, NÚMERO 1, 2015



**Órgano internacional de Difusión de la
Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C.**

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

SOCIEDAD MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA, A. C.

Editor en Jefe * Editor in Chief

Dr. Gustavo Mora Aguilera, Colegio de Postgraduados

Editor Técnico * Technical Editor

Lic. Ma. Yunuén López Muratalla

Composición Web * Web Composition

Ing. Eduardo Guzmán Hernández

Editoras(es) Adjuntos * Senior Editors

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, UMSNH

Dra. Emma Zavaleta Mejía, Colegio de Postgraduados

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, Universidad Autónoma de Chihuahua

Dr. Guillermo Fuentes Dávila, INIFAP

Dr. Ángel Rebollar Alviter, Universidad Autónoma Chapingo

Comité Editorial Internacional * International Editorial Advisory Board

Dra. Liliana Aragón Caballero, Universidad Nacional Agraria. La Molina, Perú

Dra. Anna Maselli, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Venezuela

Dr. R. Kenneth Horst, Cornell University, USA

Dr. Eduardo R. French, Programa Internacional de la Papa (Retirado), Perú

Dr. Rodrigo Valverde, Louisiana State University, USA

Dr. Charles L. Wilson, USDA-ARS, Appalachian Fruit Research Station, USA

Dr. André Lévesque, Agriculture and Agri-Food, Canada

Dr. Rafael M. Jiménez Díaz, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, España

Dr. Terence L. Robinson, Cornell University, USA

Dr. Kenneth Evans, Rothamsted Research, UK

Dr. Louis K. Prom USDA-ARS, Southern Plains Research Center, USA

Dr. Rodrigo Rodríguez Kábana, Auburn University, USA

Dr. Sami Jorge Michereff, Universidad Federal Rural de Pernambuco, Brasil

Dr. Marco Hernández Bello, USDA-ARS, Postdoctoral Research Associate, USA

Editoras(es) Asociados * Associate Editors

Dr. Jairo Crsitobal Alejo, Tecnológico Nacional de México

Dr. Daniel Nieto Angel, Colegio de Posgraduados

Dr. Alejandro C. Michel Aceves, Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero

Dr. Remigio A. Guzman Plazola, Colegio de Posgraduados

Dra. Ma. de Jesús Yañez Morales, Colegio de Posgraduados

Dr. Santos Gerardo Leyva Mir, Universidad Autónoma Chapingo

Dra. Graciela Ávila Quezada, Universidad Autónoma de Chihuahua

Portada: Micelio de *Phytophthora* sp. desarrollo a dos días en agua destilada esteril, en hojas basales de piña colectadas en campo.

Original: Cesar Joel Espinosa Rodriguez.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS * SCIENTIFIC ARTICLES

Identificación de especies de *Meloidogyne* utilizando la secuenciación de regiones espaciadoras transcritas internas de ADN ribosomal de estadios juveniles * Identification of *Meloidogyne* species by sequencing of internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA of juvenile stages.

Juan Jaramillo-Pineda, Martha Guerrero-Olazarán, José Antonio Fuentes-Garibay, José María Viader-Salvado, José Lorenzo Meza-García, Lilia Hortencia Morales-Ramos.

1

Hongos Asociados a Cálices de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) Deshidratados y Almacenados en Guerrero, México * Fungi Associated to Calyxes of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Dried and Stored in Guerrero, México.

Rubicela Ruiz-Ramírez, Javier Hernández-Morales, Victoria Ayala-Escobar, Lauro Soto-Rojas, Santos Gerardo Leyva-Mir, Javier Hernández-Ruiz.

12

Etiología y evaluación de alternativas de control de la marchitez del chile de árbol (*Capsicum annuum* L.) en La Vega de Metztlán, Hidalgo, México * Etiology and evaluation of the control alternatives for wilt in chile de arbol (*Capsicum annuum* L.) in La Vega, Metztlán, Hidalgo, México.

Nanci Lozano Alejo, Remigio A. Guzmán-Plazola, Emma Zavaleta Mejía, Víctor Heber Aguilar Rincón, Victoria Ayala Escobar.

31

ARTÍCULO DE REVISIÓN * REVISION ARTICLES

***Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control** * *Lasiodiplodia theobromae* in Agricultural Crops in México: Taxonomy, Host, Diversity and Control.

Paola Alejandra Picos-Muñoz, Raymundo Saúl García-Estrada, Josefina León-Félix, Adriana Sañudo-Barajas y Raúl Allende-Molar

54

NOTAS FITOPATOLÓGICAS * PHYTOPATHOLOGICAL NOTES

Asociación de un *Potexvirus* como Agente Causal de Manchas Cloróticas en *Opuntia ficus-indica* * Association of a *Potexvirus* as a Causal Agent of Chlorotic Spots on *Opuntia ficus-indica*.

Berenice Alonso Barrera, Gustavo Mora Aguilera, Guadalupe Valdovinos Ponce, Daniel Leobardo Ochoa Martínez, Esteban Rodríguez Leyva, Bertha Tlapal Bolaños, Rodolfo De la Torre-Almaraz

75

Actividad antibacteriana de extractos metanol:cloroformo de hongos fitopatógenos * Antibacterial activity of methanol:chloroform extracts of phytopathogenic fungi.

María de la Soledad Lagunes-Castro, Aracely López-Monteon, Angel Ramos-Ligonio, Ángel Trigos, Alejandro Salinas, César Espinoza.

87

Escala Diagramática de Severidad para el Complejo Mancha de Asfalto del Maíz * Diagrammatic Scale Severity for Tar Spot Complex in Maize.

Lervin Hernández Ramos, José Sergio Sandoval Islas

95

Etiología de la pudrición del cogollo de la piña (*Ananas comosus*. L. Merrill) cultivar MD2 en Isla, Veracruz, México * Etiology of the heart rot of pineapple (*Ananas comosus*. L. Merrill) MD2 cultivar in Isla, Veracruz, México

César Joel Espinosa-Rodríguez, Daniel Nieto-Angel, Carlos De León-García de Alba, Ángel Villegas-Monter, Luis Alfonso Aguilar-Pérez, Victoria Ayala-Escobar.

104

Identificación de especies de *Meloidogyne* utilizando la secuenciación de regiones espaciadoras transcritas internas de ADN ribosomal de estadios juveniles

Identification of *Meloidogyne* species by sequencing of internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA of juvenile stages

Juan Jaramillo-Pineda, Martha Guerrero-Olazarán, José Antonio Fuentes-Garibay, José María Viader-Salvadó, José Lorenzo Meza-García, Lilia Hortencia Morales-Ramos, Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología, Pedro de Alba s/n, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. C.P. 66450 Tel/fax (81) 83294000, ext. 7304, Fax/ext. 6415. Correspondencia: (lilia.moralesrm@uanl.edu.mx).

Recibido: Mayo 30, 2014 **Aceptado:** Diciembre 15, 2014

Jaramillo-Pineda J, Guerrero-Olazarán M, Fuentes-Garibay JA, Viader-Salvadó JM, Meza-García JL y Morales-Ramos LH. 2015. Identificación de especies de *Meloidogyne* utilizando la secuenciación de regiones espaciadoras transcritas internas de ADN ribosomal de estadios juveniles. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 1-11.

Resumen. Usualmente, la identificación de especies de *Meloidogyne* está basada en la morfología de hembras adultas, lo que dificulta la identificación de hembras y machos juveniles (J_2). Los nematodos son considerados entre los animales más difíciles de identificar, el uso de marcadores genéticos basados en el ADN ribosomal (ADNr) ha ganado aceptación en aplicaciones que van desde las determinaciones de cuarentena a las evaluaciones de la biodiversidad. Los nematodos del género *Meloidogyne* son conocidos por su habilidad para producir cambios fisiológicos en el sistema radical de las plantas y causar pérdidas en la absorción de nutrientes. El objetivo de este estudio fue determinar si la secuenciación de regiones espaciadoras transcritas (ITS) internas de ADNr pueden ser usadas como marcadores genéticos para la identificación

Abstract. Usually the identification of the *Meloidogyne* species is based on the morphology of adult females, making it difficult to identify juvenile males and females (J_2). Nematodes are considered among the most difficult animals to identify; the use of ribosomal DNA (rDNA)-based diagnostic methods have gained acceptance in applications ranging from quarantine determinations to assessments of biodiversity. Nematodes of the genus *Meloidogyne* are known for their ability to produce physiological changes in the root system of plants and cause losses in the absorption of nutrients. The objective of this study was to determine if the sequencing of internal transcribed spacer (ITS) regions of rDNA can be used as genetic markers for reliable identification of populations of juvenile males and females (J_2) for the main species of the genus *Meloidogyne*. From samples of diseased tomato roots (*Solanum lycopersicum* L.), larvae of juvenile females and males of *Meloidogyne* were collected for the DNA extraction. A rDNA region harboring two ITS regions was amplified. For subsequent sequencing, that region was ligated into pGEM®-T vector.

confiable de poblaciones de hembras y machos juveniles (J_2) para las principales especies del género *Meloidogyne*. De muestras de raíces enfermas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se extrajeron larvas de hembras y machos juveniles de *Meloidogyne* para la extracción de ADN. Se amplificó una región génica del ADNr que contiene dos regiones ITS. Para su posterior secuenciación, dicha región se ligó al vector pGEM®-T. El análisis con el programa BLASTn indicó que la región génica presentó una identidad del 99.8 % respecto a una secuencia génica perteneciente a *Meloidogyne incognita* Kofoid & White, 1919. Tal resultado sugiere que las regiones ITS pueden ser usadas como un marcador genético en poblaciones de *Meloidogyne* para la identificación de especie.

Palabras clave: *Meloidogyne incognita*, ITS, ADN ribosomal (ADNr).

Los nematodos del género *Meloidogyne* son conocidos por su habilidad para producir cambios fisiológicos en el sistema radicular de las plantas y causar pérdidas en la absorción de nutrientes afectando su crecimiento (enanismo) y su producción (Wishart *et al.*, 2002). Sin embargo, los efectos de los nematodos sobre los cultivos son subestimados por agricultores y técnicos agrícolas debido a los síntomas no específicos, que suelen confundirse con desórdenes nutrimentales, estrés hídrico, problemas de fertilidad del suelo, y con otras infecciones secundarias inducidas por hongos y bacterias, cuya entrada suele estar facilitada por la acción del nematodo. Según Zuckerman *et al.* (1990), los nematodos parásitos de plantas reducen la producción agrícola mundial entre 12 y 20 %. Aunque existen al menos 70 especies descritas de nematodos formadores de nódulos de la raíz, la atención taxonómica se ha enfocado en seis (*Meloidogyne incognita* Kofoid & White, 1919, *M. javanica*

Analysis with the BLASTn program showed that the gene region identified 99.8 % with a gene sequence belonging to *Meloidogyne incognita* Kofoid & White, 1919. This result suggests that the ITS regions can be used as a genetic marker in populations for *Meloidogyne* species identification.

Key words: *Meloidogyne incognita*, ITS, Ribosomal DNA (rDNA).

The nematodes of the *Meloidogyne* genus are known for their ability to produce physiological changes in the root system of plants and cause losses in the absorption of nutrients, affecting their growth (dwarfism) and their production (Wishart *et al.*, 2002). However, the effects of the nematodes on crops are underestimated by farmers and agricultural technicians due to the non-specific symptoms, that are often mistaken for lack of nutrients, water stress, problems of soil fertility, and with other secondary infections caused by fungi or bacteria, the entry of which is made easier by the nematode. According to Zuckerman *et al.* (1990), the parasite nematodes of the plants diminish the global agricultural production between 12 and 20%. Even though there are at least 70 nematode species that cause root nodules, taxonomic attention has focused on six of them (*Meloidogyne incognita* Kofoid & White, 1919, *M. javanica* Treub, 1885, *M. arenaria* Neal, 1889, *M. chitwoodi* Golden *et al.*, 1980, *M. fallax* Karssen, 1996 y *M. hapla* Chitwood, 1949) due to the fact that these are typically associated with agronomically important plants (Adam *et al.*, 2007). For the identification of species and populations of *Meloidogyne*, several methods have been used, although all of them have their limitations (Zijlstra *et al.*, 1995). It is important to determine the composition of species of *Meloidogyne* in crops in order to implement control

Treub, 1885, *M. arenaria* Neal, 1889, *M. chitwoodi* Golden *et al.*, 1980, *M. fallax* Karssen, 1996 y *M. hapla* Chitwood, 1949) ya que están asociadas típicamente con plantas agrónomicamente importantes (Adam *et al.*, 2007). Para la identificación de especies y poblaciones de *Meloidogyne* se han aplicado varios métodos aunque todos tienen sus limitaciones (Zijlstra *et al.*, 1995). Es importante determinar la composición de especies de *Meloidogyne* en cultivos con el propósito de introducir estrategias de control no químicas, como la rotación de cultivares resistentes y plantas alelopáticas (Cenis, 1993; Orui, 1998). La identificación de especies de *Meloidogyne* está basada en la morfología de las hembras adultas (Eisenback *et al.*, 1981) y la gama de hospedantes (Williamson *et al.*, 1997), siendo difícil la identificación para machos y hembras juveniles de segundo estadio (J_2). También se utiliza el análisis de isoenzimas, donde la comparación de patrones de esterasa muestran gran consistencia en la separación de las cuatro especies de mayor distribución en el mundo, sin embargo, no detecta variación intraespecífica entre nematodos de *Meloidogyne* (Volvas *et al.*, 2005). Los diagnósticos basados en ADN proveen atractivas soluciones a los problemas asociados con estos métodos de identificación, ya que son independientes tanto de los productos expresados del genoma como de la influencia del ambiente y el estadio de los nematodos (Wishart *et al.*, 2002; Powers, 2004). La mayoría de los análisis de ADN dirigidos a nematodos formadores de agallas usan ADN total (genómico y mitocondrial [ADNmt]) o ADNmt y son predominantemente a través de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLPs por sus siglas en inglés) (Zijlstra *et al.*, 1995; Orui, 1998; Powers, 2004). La comparación de secuencias de regiones espaciadoras transcritas internas (ITS, por sus siglas en inglés) de ADN ribosomal (ADNr) es usada en taxonomía, ya que tiene un alto grado de

strategies that do not involve any chemicals, such as the rotation of resilient cultivars and allelopathic plants (Cenis, 1993; Orui, 1998). The identification of *Meloidogyne* species is based on the morphology of adult females (Eisenback *et al.*, 1981) and the range of hosts (Williamson *et al.*, 1997), making the identification for young males and females of the second stage (J_2) more difficult. The analysis of isoenzymes is also used, where the comparison of patterns of esterase show a great consistency in the division of the four species most widely distributed in the world; however, it does not detect any intraspecific variation among *Meloidogyne* nematodes (Volvas *et al.*, 2005). The diagnoses based on the DNA provide some attractive solutions for the problems associated with these methods of identification, due to the fact that they are independent from the products expressed in the genome and from the influence of the environment and the stage of the nematodes (Wishart *et al.*, 2002; Powers, 2004). Most DNA analyses directed at nematodes that cause the formation of galls use total DNA (genomic and mitochondrial [mtDNA]) or mtDNA, and are predominantly done through Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) (Zijlstra *et al.*, Oruri, 1998; Powers, 2004). The comparison between sequences of internal transcribed spacer regions (ITS) of ribosomal DNA (rDNA) is used in taxonomy, due to its high level of polymorphism between closely related species and is virtually a constant for one specific species. Furthermore, the ITS regions are lined by retained sequences that facilitate the design of indicators for their expansion by the Polymerase chain reaction (PCR).

The objective of this study is to determine if the internal transcribed spacer regions of rDNA can be used as genetic markers for the reliable identification of young female and male J_2 populations for the main species of the *Meloidogyne* genus.

polimorfismo entre especies estrechamente relacionadas y es prácticamente constante para una especie específica. Además las regiones ITS son flanqueadas por secuencias conservadas que facilitan el diseño de iniciadores para su amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés).

El objetivo de este estudio fue determinar si las regiones espaciadoras transcritas (ITS) internas de ADNr pueden usarse como marcadores genéticos para la identificación confiable de poblaciones de hembras y machos juveniles J₂ para las principales especies del género *Meloidogyne*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Los juveniles J₂ de *Meloidogyne* se obtuvieron usando la técnica del embudo de Baermann (Agrios, 2005) de raíces de plantas agalladas de tomate (*Solanum lycopersicum*), un cultivo ubicado en San Nicolás de los Garza Nuevo León, proporcionadas por el Departamento de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, e identificadas como género *Meloidogyne* por claves taxonómicas para la identificación de nematodos parásitos de plantas (Zuckerman *et al.*, 1990).

Identificación del nematodo

El ADN genómico se aisló de 5000 nematodos (J₂) usando una lisis con detergentes seguido por una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Sambrook y Russell, 2001). Los especímenes se recolectaron por centrifugación a 16,000 g por 5 min, y el pellet se resuspendió en 200 µL de amortiguador lisis TSNT (2 % Tritón X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA, pH 8), 500 µL de fenol saturado con Tris-HCl y 100 µL de una mezcla cloroformo:

MATERIALS AND METHODS

Biological Material

The juvenile J₂ of *Meloidogyne* were obtained using the Baermann funnel technique (Agrios, 2005) of tomato plant roots with gall formations (*Solanum lycopersicum*), a farm located in San Nicolás de los Garza Nuevo León, provided by the Department of Plant Pathology of the Faculty of Life Sciences at the Autonomous University of Nuevo León, and identified as belonging to the *Meloidogyne* genus by taxonomic keys for the identification of parasitic plant nematodes (Zuckerman *et al.*, 1990).

Identification of the nematode

The genomic DNA was isolated from 5000 nematodes (J₂) using lysis with detergents followed by an extraction with phenol-chloroform-amyl alcohol (Sambrook and Russell, 2001). The specimens were collected through centrifugation at 16,000 g for 5 minutes and the pellet was resuspended in 200 µL of lysis buffer TSNT (2 % Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM, Tris-HCl and 1mM EDTA, pH 8), 500 µL of saturated phenol with Tris-HCl and 100 µL of a mixture of chloroform: amyl alcohol (24:1). The suspension was mixed in vortex for 5 minutes and 200 µL of buffer TE 1X were added (10mM Tris-HCl and 1 mM EDTA, pH 8.0); the phases were separated by centrifugation at 16,000 g for 10 minutes, the DNA settled on the aqueous phase with pure ethanol. The DNA pellets were dried at room temperature for 10 minutes and were resuspended in 48 µL of TE buffer, 2 µL of 2 µg µL⁻¹ RNase and quantified through agarose gel densitometry dyed with GelRed 1X (Biotium, Hayward, CA) solution, using the EDAS 290 system and the Kodak Digital Science 1D (Eastman Kodak Company, Rochester, New York) program.

A fragment of rDNA was amplified by PCR using the ITS1 (5'-TTGAACCGGGCAAAAGTCG-3')

alcohol isoamílico (24:1). La suspensión se mezcló en vortex por 5 min y se agregaron 200 µL de amortiguador TE 1X (10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA, pH 8.0); las fases se separaron por centrifugación a 16,000 g por 10 min y el ADN se precipitó de la fase acuosa con etanol puro. Los pellets de ADN se secaron a temperatura ambiente por 10 min y resuspendieron en 48 µL de amortiguador TE, 2 µL de 2 µg µL⁻¹ RNasa y cuantificaron por densitometría en geles de agarosa teñidos con solución GelRed 1X (Biotium, Hayward, CA) usando el sistema EDAS 290 y el programa Kodak Digital Science 1D (Eastman Kodak Company, Rochester, New York).

Un fragmento ADN_r fue amplificado por PCR usando el iniciador ITS1 (5'-TTGAACCGGGCA-AAAGTCG-3') y el iniciador ITS2 (5'-TTAGTTTCTTTTCTCCGCT-3') dirigidos a las regiones 3' y 5' del ADN_r 18S y 28S, respectivamente (Stock *et al.*, 2001; Meza-García *et al.*, 2014). La PCR se realizó en un termociclador TC020-24 MultiGene Mini (Labnet International, Inc., Edison, NJ) en un volumen final de 25 µL conteniendo 1X buffer GoTaq PCR (Promega, Madison, WI), 200 ng de ADN genómico, 200 µM de cada dNTPs, 0.5 µM de cada iniciador, agua estéril y 1 U de GoTaq DNA polimerasa (Promega, Madison, WI). Se usó un programa de amplificación de 32 ciclos: 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 75 s, con una primera etapa de desnaturalización de 94 °C por 3 min y una etapa final de elongación de 72 °C por 5 min. Un plásmido que contiene un fragmento de regiones ITS de *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar & David 1992, (pGEMITSLZO), se usó como testigo positivo de la PCR y como negativo los componentes de la mezcla de PCR sin ADN. Los productos de la PCR se analizaron en un gel de electroforesis de agarosa 2.5 % teñido con solución GelRed 1X, usando una unidad de electroforesis horizontal MSMUNIDUO (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), 100 volts por 60 min, y el producto

initiator and the ITS2 (5'-TTAGTTTCTTTTCTCCGCT-3') initiator, directed at the regions 3' and 5' of the rDNA 18S and 28S, respectively (Stock *et al.*, 2001; Meza-García *et al.*, 2014). PCR was carried out in a TC020-24 MultiGene Mini (Labnet International, Inc., Edison, NJ) thermal cycler, with a final volume of 25 µL containing 1X buffer GoTaq PC (Promega, Madison, WI), 200 ng of genomic DNA, 200 µM of each dNTPs, 0.5 µM of each initiator, sterilized water and 1 U of GoTaq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI). An amplification program of 32 cycles was used: 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 75 s, with a first denaturing stage of 94 °C for 3 min and a final elongation stage of 72 °C for 5 min. A plasmid that contains a fragment of ITS regions of *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar & David 1992, (pGEMITSLZO) was used as a positive control of the PCR and the components of the PCR without DNA were used as negative control. The products of the PCR were analyzed in an electrophoresis with agarose gel 2.5 % dyed with GelRed 1X solution, using one unit of horizontal electrophoresis MSMUNIDUO (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), 100 volts for 60 minutes, and the product of the amplification was cloned in the pGEM®-T (Promega) vector, following the instructions of the manufacturer. The mixture of the ligation was used to transform cells of *Escherichia coli* DH5α, the transformed cells were selected through a white-blue test in agar slates LB with ampicillin (100µg mL⁻¹), 100 µL IPTG (isopropil-β-D-1-thiogalactopyranoside) (2 mg mL⁻¹). The resulting cell colonies of the transformed cells were analyzed in order to detect the presence of plasmid DNA through the extraction by alkaline lysis with an agarose gel 0.8 % dyed with GelRed 1X solution. Furthermore, the correct insertion of the amplified product in the pGEM®-T vector was confirmed through PCR using the ITS1 and ITS2 initiators, as was previously described.

del amplificado se clonó en el vector pGEM®-T (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de la ligación se usó para transformar células de *Escherichia coli* DH5 α , las células transformadas se seleccionaron por una prueba azul-blanco en placas de agar LB con ampicilina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 100 μL IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) (2 mg mL^{-1}). Las colonias resultantes de las células transformados se analizaron para detectar la presencia del ADN plasmídico mediante una extracción por lisis alcalina y en un gel de agarosa 0.8 % teñido con solución GelRed 1X. Además, la correcta inserción del producto amplificado en el vector pGEM®-T se confirmó por PCR usando los iniciadores ITS1 y ITS2, tal como se describió anteriormente.

Los seis plásmidos positivos por PCR de diferentes colonias de *E. coli* se secuenciaron usando los iniciadores T7 y SP6 (Promega) y un analizador genético ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA) en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma de México (UNAM).

Las secuencias T7 y SP6 (12 secuencias en total) se alinearon usando el módulo Contig Assembly Program del programa BioEdit v7.0.8.0 (Hall, 1999) y la secuencia consenso se comparó con secuencias nucleotídicas en bases de datos usando la herramienta nucleotide BLAST (BLASTn) del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI). El género y especie del organismo con la secuencia nucleotídica de mayor identidad a la secuencia consenso se consideró como el género y especie del nematodo analizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método de extracción de ADN produjo 25 μg de ADN genómico de alta calidad (DO260/DO280

The six positive plasmids by PCR of different colonies of *E. coli* were sequenced using the T7 and SP6 (Promega) initiator and a genetic analyzer ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA) in the Unit of Molecular Biology of the Institute of Cellular Physiology of the Autonomous University of Mexico (UNAM).

The T7 and SP6 sequences (12 sequences in total) were aligned using the Contig Assembly Program module of the BioEdit v7.0.8.0 (Hall, 1999) program and the consensus sequence was compared to the nucleotide sequences in the databases using the nucleotide BLAST (BLASTn) tool of the National Center of Information about Biotechnology (NCBI). The genus and species of the organism with the nucleotide sequence most related to the consensus sequence was considered as the genus and species of the analyzed nematode.

RESULTS AND DISCUSSION

The DNA extraction method produced 25 μg of high quality genomic DNA (DO260/DO280 1.9) without any visible degradation. The analysis in agarose gel for the amplified product by PCR of genomic DNA showed a band of 608 pb, and for the positive control (*H. indica*) a band of 890 pb was obtained. Likewise, the analysis of PCR of 6 different plasmids of different transformed *E. coli* colonies confirmed the presence of the rDNA fragment inside the extracted plasmids (Figure 1B).

The 66 identity percentages (BioEdit identity matrix) in pairs of the 12 nucleotide sequences (T7 and SP6 sequences of the 6 sequenced plasmids) oscillated between 99.6 and 100%, which allowed the calculation of a consensus sequence. Furthermore, the consensus nucleotide sequence presented an identity of 99.8% (2 differences, one generated by the ITS1 oligonucleotide) with a rDNA

1.9) sin aparente degradación. El análisis en gel de agarosa para el producto amplificado por PCR de ADN genómico mostró una banda 608 pb y mientras que para el control positivo (*H. indica*) se obtuvo una banda de 890 pb (Figura 1A). Del mismo modo, el análisis de PCR de 6 plásmidos de diferentes colonias de *E. coli* transformadas confirmó la presencia del fragmento de ADN dentro de los plásmidos extraídos (Figura 1B).

Los 66 porcentajes de identidad (matriz de identidad BioEdit) por pares de las 12 secuencias nucleotídicas (secuencias T7 y SP6 de los 6 plásmidos secuenciados) oscilaron entre 99.6 y 100 %, lo cual permitió calcular una secuencia consenso. Además, la secuencia nucleotídica consenso presentó una identidad del 99.8 % (2 diferencias, una generada por el oligonucleótido ITS1) con una región ADN de *M. incognita* (Figura 2) que incluye la región 3' de 18S, el espaciador transcrito interno 1, la región

region of *M. incognita* (Figure 2) that includes the region 3' of 18S, the internal transcribed spaces, the region 5.8S, the internal transcribed spacer 2 and a portion of the region and 5' 28S. Therefore, the unknown nematode was identified as *Meloidogyne incognita*, confirming the presence of this species in the state of Nuevo León (México).

In México, the Secretary of Agriculture, Livestock, Rural Developments, Fisheries and Food (SAGARPA) reported the presence of the nematode *M. incognita*, which is a significant pest for the state of Nuevo León (SENASICA-CNRF- Department of Plague Risk Analysis 2012). Usually, the species of the nematode of the *Meloidogyne* genus are identified by taxonomic keys in accordance to the morphological characteristics observed under the microscope (Powers, 2004). The morphological criteria represent a problem due to the variability and the need of experienced personnel in order to

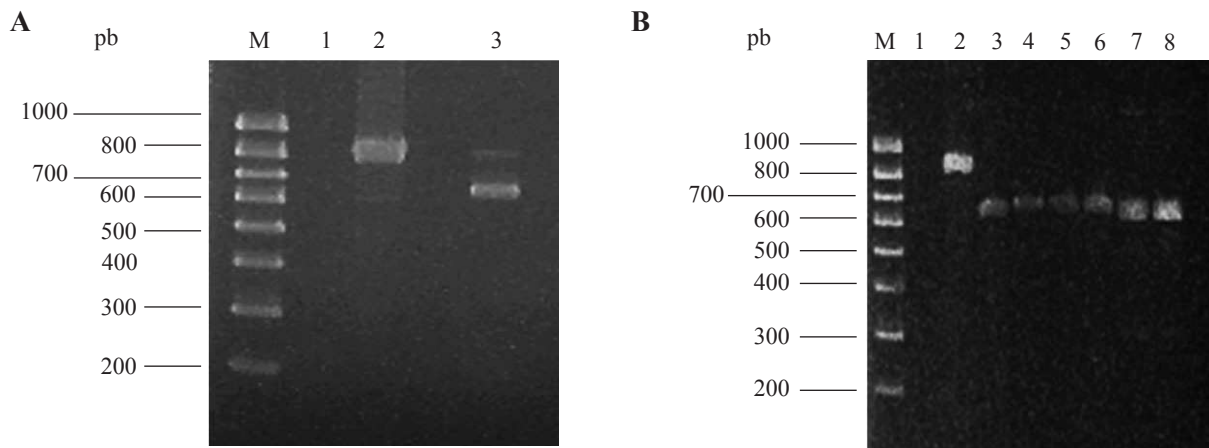


Figura 1. Productos de amplificación por PCR a partir de ADN genómico de nematodos juveniles (A) o varios plásmidos de diferentes colonias de *E. coli* transformadas (B). En A: Carril M, marcador de tamaño molecular Hyperlader IV (Bioline, London, UK); carril 1, control negativo; carril 2, control positivo (pGEMITSLZO); carril 3, el producto amplificado de 608 pb. En B: Carril M, marcador de tamaño molecular Hyperlader IV (Bioline, London, UK); carril 1, control negativo; carril 2, control positivo (pGEMITSLZO); carriles 3-8, plásmidos de diferentes transformantes (608 pb).

Figure 1. Amplification products by PCR from a genomic DNA of juvenile nematodes (A) or several plasmids of different transformed *E. coli* colonies (B). In A: Lane M, molecular sized marker Hyperlader IV (Bioline, London, UK); lane 1, negative control; lane 2, positive control (pGEMITSLZO); lane 3, the amplified product of 608 pb. In B: Lane M, molecular sized marker Hyperlader IV (Bioline, London, UL); lane 1, negative control; lane 2, positive control (pGEMITSLZO); lanes 3-8, plasmids of different transformants (608 pb).

```

>gb|AY438556.1| Meloidogyne incognita T1A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence;
internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,
and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and
28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=768

      Score = 1112 bits (602),   Expect = 0.0
      Identities = 606/608 (99%), Gaps = 0/608 (0%)
      Strand=Plus/Plus

Query  1      TTGAACCGGGTAAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCTGCTGGATCATTAC  60
          |||
Sbjct 131      TTGAACCGGGCAAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAACCTGCTGCTGGATCATTAC  190

Query  61      TTTATGTGATGTTCAAATTTGAATTCGCAATGAAATGATCGTTGTGAAACGGCTGTCGCT  120
          |||
Sbjct 191      TTTATGTGATGTTCAAATTTGAATTCGCAATGAAATGATCGTTGTGAAACGGCTGTCGCT  250

Query  121     GGTGTCTAAGTGTGCTGATACGGTTGTGAACGTCCGTGGCTGTATATGTGGTGACATGT  180
          |||
Sbjct 251     GGTGTCTAAGTGTGCTGATACGGTTGTGAACGTCCGTGGCTGTATATGTGGTGACATGT  310

Query  181     TAGGACTCTAATGAGTTTAAAGACCTAATGAGCCTCTTAAAGTGAAGCCGCCAGCAACctt  240
          |||
Sbjct 311     TAGGACTCTAATGAGTTTAAAGACCTAATGAGCCTCTTAAAGTGAAGCCGCCAGCAACCTT  370

Query  241     tttttCTCTACATTTTaaaaaaaaaCTAAAATCTACCCTTATCGGTGGATCACTAGGC  300
          |||
Sbjct 371     TTTTCTCTACATTTTAAAAAAAAAACTAAAATCTACCCTTATCGGTGGACCCTAGGC  430

Query  301     TCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCAAACCTGCGATAATTATTGCGAACTGCAGAAGTATTG  360
          |||
Sbjct 431     TCGTGGATCGATGAAGAACGCAGCAAACCTGCGATAATTATTGCGAACTGCAGAAGTATTG  490

Query  361     AGCACAAAAGTTTTGAAACGCAAATGGCCGCAATGAGGTCAAACCTCTTTGCAACGCTGGT  420
          |||
Sbjct 491     AGCACAAAAGTTTTGAAACGCAAATGGCCGCAATGAGGTCAAACCTCTTTGCAACGCTGGT  550

Query  421     TCAGGGTCATTTCTCTTATAGCGGAAGCTTTAATTTCTATAATGATGTTGTTGCTTTAT  480
          |||
Sbjct 551     TCAGGGTCATTTCTCTTATAGCGGAAGCTTTAATTTCTATAATGATGTTGTTGCTTTAT  610

Query  481     ATTTTAAAAGGATTTTGTGTTTATTCATGTATTAAATCTAACTGTGAAAATCAAACAATTT  540
          |||
Sbjct 611     ATTTTAAAAGGATTTTGTGTTTATTCATGTATTAAATCTAACTGTGAAAATCAAACAATTT  670

Query  541     TGACCTGAACTCAGTCGAGAGCACCCGCTGAACTTAAGCATATCAGTAAGCGGAGGAAAA  600
          |||
Sbjct 671     TGACCTGAACTCAGTCGAGAGCACCCGCTGAACTTAAGCATATCAGTAAGCGGAGGAAAA  730

Query  601     GAAACTAA  608
          |||
Sbjct 731     GAAACTAA  738
    
```

Figura 2. Análisis BLASTn de la secuencia consenso de un fragmento de ADNr de nematodos juveniles amplificada por PCR (Query), que muestra el alineamiento con una secuencia de ADNr de *M. incognita* (Sbjct), código de GenBank AY438556.

Figure 2. BLASTn Analysis of the consensus sequence of a fragment of rDNA of juvenile nematodes amplified through PCR (Query), that shows the alignment with a rDNA sequence of *M. incognita* (Sbjct), GenBank code AY438556.

5.8S, el espaciador transcrito interno 2 y una parte de la región y 5' 28S. Por tanto, el nematodo desconocido fue identificado como *Meloidogyne*

achieve the reliable identification of the species (Williamson *et al.*, 1997). The identification of *Meloidogyne* spp. is based on the morphology of the

incognita, confirmando la presencia de esta especie en el estado de Nuevo León (México).

En México, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) reportó la presencia del nematodo *M. incognita*, la cual es una plaga importante para el estado de Nuevo León (SENASICA-CNRF-Departamento de Análisis de Riesgo de Plagas 2012). Comúnmente, las especies de nematodos del género *Meloidogyne* son identificados por claves taxonómicas de acuerdo con las características morfológicas observadas bajo el microscopio (Powers, 2004). Los criterios morfológicos representan un problema debido a la variabilidad y la necesidad de personal con experiencia para lograr una identificación fiable de la especie (Williamson *et al.*, 1997). La identificación de *Meloidogyne* spp. se basa en la morfología de las hembras adultas (Eisenback *et al.*, 1981). Sin embargo, un método rápido para la identificación de nematodos en la etapa J₂ podría mejorar las decisiones para el manejo óptimo de los cultivos infectados (Powers y Harris, 1993).

En este trabajo, se logró la identificación de una especie de nematodo fitoparásito de raíz usando la secuencia de regiones ITS de ADNr. El protocolo utilizado facilita la identificación o confirmación de las especies, evitando la dependencia de personal experimentado para la correcta identificación de los nematodos por el uso de claves taxonómicas.

Otros métodos de extracción de ADN usados para el ADN genómico a partir de los nematodos fitoparásitos, incluyen una ruptura del tejido celular por presión (Powers y Harris, 1993), el uso de soluciones de lisis con proteinasa K (Williamson *et al.*, 1997), y la extracción de ADN con fenol-cloroformo seguido de precipitación con etanol (Williamson *et al.*, 1997) o isopropanol (Blok *et al.*, 1997). En este trabajo se usó buffer TSNT como solución de lisis y el fenol-cloroformo- alcohol isoamílico para la extracción de ADN. Este método permitió

adult females (Eisenback *et al.*, 1981). However, a quick method for the identification of nematodes in the J₂ stage could improve decision making for the optimal handling of infected crops (Powers and Harris, 1993).

In this work, the identification of a species of phytoparasitic root nematode using the ITS regions sequence of rDNA was achieved. The protocol used facilitates the identification or confirmation of the species, preventing the need for experienced personnel for the correct identification of the nematodes through the use of taxonomic keys.

Other DNA extraction methods used for the genomic DNA starting from the phytoparasitic nematodes, include the rupture of the cellular tissue through pressure (Powers and Harris, 1993), the use of lysis solutions with proteinase K (Williamson *et al.*, 1997), and the extraction of DNA with phenol-chloroform followed by precipitation with ethanol (Williamson *et al.*, 1997) or isopropanol (Blok *et al.*, 1997). In this work, TSNT buffer was used as a lysis solution and the phenol-chloroform amyl alcohol was used for the extraction of DNA. This method allowed for the procurement of high quality genomic DNA for the amplification through PCR of the ITS regions of the rDNA.

The CDFA (California Department of Food and Agriculture, U.S.A.) includes the use of molecular methods in its protocol for the identification of the genus and species of different parasite nematodes present in plants, such as the Restriction Fragment Length Polymorphism of Amplified products (PCR-RFLP) (Dong, 2007). 5238 sequences of nematode ITS sequence regions are currently in the database of GenBank; among these sequences, 139 correspond to nematodes of the *Meloidogyne* genus. Therefore, the sequencing of ITS regions of problematic nematodes and the search in the nucleotide database is an appropriate alternative for their identification.

obtener ADN genómico de alta calidad suficiente para llevar a cabo la amplificación por PCR de las regiones ITS del ADNr.

La CDFA (Departamento de Alimentos y Agricultura de California, EE.UU.) incluye el uso de métodos moleculares en sus protocolos para la identificación de los géneros y especies de diferentes nematodos parásitos de las plantas, como polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de productos amplificados (PCR-RFLP) (Dong, 2007). Actualmente en la base de datos GenBank se encuentran 5238 secuencias de regiones ITS de nematodos, de estas secuencias 139 corresponden a nematodos del género *Meloidogyne*. Por lo tanto, la secuenciación de regiones ITS de nematodos problemáticos y la búsqueda en bases de datos de nucleótidos es una alternativa adecuada para su identificación.

CONCLUSIONES

Los métodos moleculares y bioinformáticos son una herramienta útil y rápida para el diagnóstico de fitoparásitos del género *Meloidogyne*. Este estudio aporta una opción rápida para la identificación de nematodos en etapas juveniles y además demuestra que la amplificación y análisis de regiones ITS es otra opción además de los métodos tradicionales. La claridad de los resultados permite la identificación de más especies de nematodos, además es un método fácil, adecuado tanto para juveniles machos como hembras, no dependiente de criterios subjetivos y que no requiere del apoyo inmediato de especialistas en taxonomía de nematodos fitoparásitos.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo del proyecto Clave CT2909-10 (PAICYT) de la Universidad Autónoma de Nuevo

CONCLUSIONS

The molecular and bioinformatic methods are useful and quick tools for the diagnosis of phytoparasites of the *Meloidogyne* genus. This study provides a quick solution for the identification of nematodes in juvenile stages and also demonstrates that the amplification and analysis of ITS regions represents another option besides that of traditional methods. The clarity of the results allows for the identification of more species of nematodes, it is also an easy method, appropriate for both male and female juveniles, non-dependent of subjective criteria and does not require the immediate support of phytoparasitic nematode taxonomy experts.

Acknowledgements

We appreciate the support of this project with the key number CT2909-10 (PAICYT) of the Autonomous University of Nuevo León. J.J.-P., J.A.F.-G. y J.L.M.-G., and to CONACYT for their scholarships. We also thank MC Nabor González Garza for the supply and morphological identification of the biological material and to Sergio M. Salcedo Martínez, PhD. for his stylistic suggestions during the preparation of the manuscript.

~~~~~ Finaliza la versión en Inglés ~~~~~

León. J.J.-P., J.A.F.-G. y J.L.M.-G. y al CONACYT por sus becas. También damos las gracias al MC Nabor González Garza por el suministro y la identificación morfológica del material biológico y al Dr. Sergio M. Salcedo Martínez por sus sugerencias estilísticas en la preparación del manuscrito.

## LITERATURA CITADA

Adam MAM, Phillips MS, Blok VC. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven



- common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology*. 56:190-197.
- Agrios GN, 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Academic Press. New York, USA. 922p.
- Blok VC, Philips MS, and Fargette M. 1997. Comparison of sequences from the ribosomal DNA intergenic region of *Meloidogyne mayaguensis* and other major tropical root-knot nematodes. *Journal of Nematology*. 29:16-22.
- Cenis JL. 1993. Identification of four Major *Meloidogyne* spp. by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathology*. 83:76-80.
- Dong K. 2007. PCR-RFLP Identification of *Globodera pallida*, *G. rostochiensis*, *Heterodera* spp. and *Meloidogyne* spp. Available at: [http://www.cdfa.ca.gov/plant/PPD/nematode\\_molecular.html](http://www.cdfa.ca.gov/plant/PPD/nematode_molecular.html). (Consulta, septiembre 2013).
- Eisenback JD, Hirschmann H, Sasser JN, and Triantaphyllou AC. 1981. A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species), with a pictorial key. *Journal of Nematology*. 13: 513-521.
- Hall TA. 1999. BioEdit: A user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Meza-García JL, Eías-Santos M, Cortez-Mondaca E, Guerrero-Olazarán M, Viader-Salvadó JM, Luna-Olvera HA, Maldonado-Blanco MG, Quintero-Zapata I, and Pereyra-Alfárez B. 2014. Evaluation of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) Nematode Strain from Sinaloa, Mexico, against *Bemisia tabaci* Immatures under Laboratory Conditions. *Southwestern Entomologist*. 39(4), en impresión.
- Orui Y. 1998. Identification of Japanese species of the genus *Meloidogyne* (Nematoda: Meloidogynidae) by PCR-RFLP analysis. *Journal of Applied Entomology*. 33: 43-51.
- Powers TO. 2004. Nematode molecular diagnostics: From Bands to Barcodes. *The Annual Review of Phytopathology*. 42:367-383.
- Powers TO, Harris TS. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*. 25:1-6.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA. 2100p.
- SENASICA-CNRF-Departamento de Análisis de Riesgo de Plagas. 2012. Ficha técnica de *Meloidogyne incognita*. Available at: <http://www.encuentra.gob.mx/resultsAPF.html?q=Meloidogyne%20incognita&client=sagarpa&ts=all&geo=0>. (Consulta, septiembre 2013).
- Stock SP, Campbell JF, and Nadler SA. 2001. Phylogeny of *Steinernema travassos*, 1927 (Cephalobina: *Steinernema*) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology*. 87:877-889.
- Vovlas N, Mifsud D, Landa BB and Castillo P. 2005. Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on potato. *Plant Pathology*. 54:657-664.
- Williamson VM, Caswell-Chen EP, and Westerdahl FF. 1997. A PCR assay to identify and distinguish single juveniles of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Journal of Nematology*. 29:9-15.
- Wishart J, Phillips MS, and Blok VC. 2002. Ribosomal Intergenic Spacer: A Polymerase Chain Reaction Diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, and *M. hapla*. *Phytopathology*. 92: 884-892.
- Zijlstra C, Lever AEM, Uenk BJ and Silfhout CH. 1995. Differences between ITS Regions of Isolates of Root-knot Nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Phytopathology*. 85: 1231-1237.
- Zuckerman BM, Mai WF, and Krusberg LR. 1990. *Plant Nematology Laboratory Manual Revised Edition 1990*. University of Massachusetts Agricultural Experiment Station, Massachusetts. USA. 252 p.

# Hongos Asociados a Cálices de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) Deshidratados y Almacenados en Guerrero, México

## Fungi Associated to Calyxes of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Dried and Stored in Guerrero, México

Rubicela Ruiz-Ramírez, Javier Hernández-Morales, Victoria Ayala-Escobar, Lauro Soto-Rojas, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carr. México- Texcoco, Montecillo, Texcoco, Edo. México, CP 56230, México; Santos Gerardo Leyva-Mir, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carr. México- Texcoco, Chapingo, Texcoco, Edo. México CP 56230, México; Javier Hernández-Ruiz, Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala, Km 7.5 Carr. San Martín-Tlaxcala, San Diego Xocoyucan Tlax. CP 90122. Correspondencia: (hjavier@colpos.mx).

**Recibido:** Octubre 20, 2014

**Aceptado:** Diciembre 28, 2014

Ruiz-Ramírez R, Hernández-Morales J, Ayala-Escobar V, Soto-Rojas L, Leyva-Mir, SG y Hernández-Ruiz J. 2015. Hongos asociados a Cálices de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) deshidratados y almacenados en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 12-30.

**Resumen.** Con el objetivo de determinar la calidad fitosanitaria de los cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) comercializados en la región de la Costa Chica de Guerrero, México, se colectaron 49 muestras de cálices deshidratados y almacenados en dos centros de acopio. Los resultados mostraron un contenido de humedad promedio de 14.74 % y una incidencia promedio de cálices con presencia de manchas en la superficie y/o tizón en las puntas del 56.1 %. Con base en la caracterización morfológica y molecular se aislaron e identificaron 16 géneros de hongos. Los géneros más frecuentes fueron *Aspergillus*, *Alternaria*, *Nodulisporium*, *Chaetomium* y *Thielavia*. Se determinó una diferencia en la incidencia de cálices enfermos, lo que determinó los diferentes niveles de calidad ( $\alpha=0.05$ ); asimismo, se registraron diferencias significativas en la

**Abstract.** In order to determine the phytosanitary quality of dried roselle calyxes (*Hibiscus sabdariffa*) marketed in the Costa Chica region of Guerrero, Mexico, 49 samples of dried and stored calyxes were collected in two packing plants. On average, the calyxes had a moisture content of 14.74 %, and 56.1% of calyxes had the presence of spots on the surface and/or blight on the tips. Based on morphological and molecular characteristics, the fungi was isolated and identified into 16 genera of fungi. The common isolates were *Aspergillus*, *Alternaria*, *Nodulisporium*, *Chaetomium* and *Thielavia*. The quality level of the calyxes was significantly affected by the disease incidence ( $\alpha=0.05$ ); likewise, the frequency of the incidence of the different isolates also varied between storage units ( $\alpha=0.1$ ). The storage temperature showed significant correlations with the following variables: relative humidity ( $r=-0.967$ ), light intensity ( $r=0.449$ ), moisture level of calyxes ( $r=0.352$ ) and incidence of diseased calyxes ( $r=0.281$ ); the correlation between the number of isolated genera and their frequency was negative ( $r=-0.349$ ).

frecuencia de géneros aislados entre ambos almacenes ( $\alpha=0.1$ ). La temperatura de almacenamiento mostró correlaciones significativas con las siguientes variables: humedad relativa ( $r=-0.967$ ), luminosidad ( $r=0.449$ ), humedad de los cálices ( $r=0.352$ ) e incidencia de cálices enfermos ( $r=0.281$ ); la correlación entre el número de géneros aislados y su frecuencia fue negativa ( $r=-0.349$ ).

**Palabras clave:** identificación, humedad, almacenamiento, calidad fitosanitaria

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) pertenece a la familia Malvaceae y su origen se ubica en India y Malasia. De acuerdo al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), Guerrero es el principal productor de este cultivo; en 2012 se produjeron 3943 ton en una superficie de 13 679 ha; los municipios con mayor producción fueron Ayutla de los Libres, Tecoaapa, Acapulco, San Luis Acatlán y San Marcos, que en conjunto aportaron el 85.4 % del volumen de producción estatal, con un valor de 43.9 millones de pesos.

Aproximadamente el 95 % de la producción nacional, se vende a granel para su consumo en seco. El principal problema de la cadena productiva se deriva de un deficiente manejo postcosecha, ya que el productor, regularmente, descuida la sanidad durante el proceso de deshidratado lo que trae como resultado una baja calidad del producto debido a la presencia de hongos postcosecha, lo que repercute directamente en el precio (Galicía *et al.*, 2008).

El deshidratado de los cálices debe reducir su contenido de humedad al 10-12 % para asegurar un adecuado almacenamiento (Augustburger *et al.*, 2000; FAO, 2004; McClintock y El Tahir, 2004). Lo anterior coincide con lo que indica la Norma Mexicana NMX-FF-115-SCFI-2010, donde se establece que los cálices de jamaica deben ser comercializados con una humedad máxima del 10-12 %, y un máximo de 10 UFC/g de mohos y levaduras.

**Key words:** identification, humidity, storage, phytosanitary quality.

Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) belongs to the family Malvaceae and has its origins in India and Malaysia. According to the Agriculture and Fisheries Information Service (SIAP), Guerrero is the main producer of roselle. In 2012, 3,943 tons were produced in a surface of 13,679 hectares; the municipalities with the greatest production were Ayutla de los Libres, Tecoaapa, Acapulco, San Luis Acatlán and San Marcos, which in conjunction produced 85.4 % of the volume for the state, with a value of 43.9 million pesos.

Approximately 95 % of the national production is sold in bulk for its dry consumption. The main problem in the production chain derives from poor management in the post-harvest, given that the producer regularly neglects salubrity during the drying process, which results in a low quality product given the fungi in the post-harvest, thus directly affecting the price (Galicía *et al.*, 2008).

The process of drying the calyxes must reduce humidity content to 10-12 % to ensure proper storage (Augustburger *et al.*, 2000; FAO, 2004; McClintock and El Tahir, 2004). The aforementioned coincides with what is indicated by the Mexican Norm NMX-FF115-SCFI-2010, where it is established that the roselle calyxes must be commercialized with a maximum humidity of 10-12 %, and a maximum mildew and yeast of 10 UFC/g.

There is a lack of information on the mycoflora associated with the roselle calyxes, and their importance on the direct damage and possible formation of mycotoxins. Some authors that have addressed this subject are Owusu and Odamtten (1999), Ojokoh *et al.* (2002), Omenu *et al.* (2006), Doughari *et al.* (2007) and Adebayo-tayo and Samuel (2009). Given that in the Mexican Republic no documented information has been found on

Existe escasez de información sobre la micoflora asociada a los cálices jamaica, su importancia en el daño directo y la posible formación de micotoxinas. Algunos autores que han abordado el tema son Owusu y Odamtten (1999), Ojokoh *et al.* (2002), Omemu *et al.* (2006), Doughari *et al.* (2007) y Adebayo-tayo y Samuel (2009). Dado que en la República Mexicana no se ha encontrado información documentada sobre los microorganismos asociados a los cálices de jamaica, durante su almacenamiento, y los factores podrían contribuir a su deterioro; el objetivo de la presente investigación consistió en identificar los hongos asociados a los cálices de jamaica deshidratados y almacenados, así como su incidencia y condiciones de almacenamiento que afectan su calidad fitosanitaria.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En los meses de diciembre de 2012, febrero de 2013 y mayo de 2013 y con base en un muestreo al azar (Steel *et al.*, 1997), se colectaron en total 49 muestras de 30 g cada una de cálices deshidratados de la variedad criolla en los almacenes ubicados en Ayutla municipio de Ayutla y Las Mesas municipio de San Marcos, en el estado de Guerrero.

**Identificación de hongos asociados a cálices almacenados de jamaica.** Para el aislamiento, purificación y caracterización de colonias se tomaron cinco cálices al azar por cada muestra y se cortaron en trozos de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1 % por 1.5 a 2 minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se secaron con papel absorbente estéril y se procedió a sembrar cuatro trozos por caja Petri en medio de cultivo PDA (Crous *et al.*, 2009) marca Bioxon®. Las cajas se incubaron a 25-26 °C por 10 días o hasta el desarrollo de

the microorganisms associated with the roselle calyces during their storage, and the factors that could contribute to their decline, the objective of this investigation consisted in identifying the fungi associated with the dried and stored roselle calyces, as well as their incidence and storage conditions that affect their phytosanitary quality.

## MATERIALS AND METHODS

In the months of December 2012, February 2013, and May 2013, and based on a random sampling (Steel *et al.*, 1997), 49 samples in total of dried calyces of a creole variety were collected, of 30 g each, from warehouses located in Ayutla, Ayutla, and Las Mesas, San Marcos, in the state of Guerrero.

**Identification of fungi associated with stored roselle calyces.** For the isolation, purification and characterization of colonies, five calyces were taken at random for each sample and were cut into pieces of approximately 1 cm<sup>2</sup>; they were disinfected with 1 % sodium hypochlorite for 1.5 to 2 minutes and rinsed three times with sterile distilled water; they were dried with sterile paper towels; subsequently four pieces were sown in Petri dishes with PDA culture medium (Crous *et al.*, 2009) brand Bioxon®. The dishes were incubated at 25-26 °C for 10 days or until the development of structures. Likewise, five pieces were placed in a humidity chamber and were left in natural light-dark conditions until the development of structures (Crous *et al.*, 2009). After this time, the appearance of fungal microorganisms was verified and the necessary sub-cultures were made in PDA culture medium in order to initiate the purification process with the hyphae point technique and monoconidial sowing (Leslie and Summerell, 2006; Crous *et al.*, 2009).

estructuras. De igual manera, se colocaron cinco trozos en cámara húmeda y se dejaron en condiciones de luz-oscuridad natural hasta el desarrollo de estructuras (Crous *et al.*, 2009). Después de este tiempo se verificó la aparición de microorganismos fungosos y se realizaron los sub-cultivos necesarios en medio de cultivo PDA, con el fin de iniciar el proceso de purificación con la técnica de punta de hifa y siembra monoconidial (Leslie y Summerell, 2006; Crous *et al.*, 2009). Con cada uno de los aislamientos puros, se realizó la identificación a nivel de género con base en características morfológicas macroscópicas observadas en un microscopio estereoscópico Zeiss y características microscópicas (de acuerdo al Sistema de Saccardo) con base en la medida de 100 estructuras vegetativas y reproductivas de los cultivos (Crous *et al.*, 2009), observadas al microscopio compuesto Nikon Eclipse Ci con una cámara de la serie microscopio AmScope MU 1000; la identificación se hizo con base en las claves taxonómicas de Ellis (1971), Sutton (1980), Hanlin (1997), Barnett y Hunter (1998) y Leslie y Summerell (2009).

Para la identificación molecular se realizó la extracción de DNA del micelio de las colonias crecidas en PDA y se siguió el método AP (Sambrook y Russell, 2001). En un Termociclador Techne®, modelo TC-512, se realizó el análisis de PCR para amplificar las regiones internas en los genes ribosomales (rDNA) localizados entre las subunidades 18S-5.8S-28S. Se emplearon los iniciadores universales ITS 4 (TCCTCCGCTTATTGATATG) e ITS 5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Cada mezcla de reacción contuvo 2.5 µL de amortiguador de reacción 10X, 1.25 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µL de dNTP's (Promega®), 1.0 µL de ITS 4, 1.0 µL de ITS 5, 0.5 de Taq DNA polimerasa (Promega 5 µ/µL), 2.0 µL de DNA y 16.25 µL de agua inyectable para tener un volumen final de 25 µL

With each of the pure isolates, an identification was made at the genus level based on macroscopic morphological characteristics observed through a Zeiss stereoscopic microscope, and microscopic characteristics (according to the Saccardo System) based on the measurement of 100 vegetative and reproductive structures of the cultures (Crous *et al.*, 2009), observed through a Nikon Eclipse Ci compound microscope with a series AmScope MU 1000 microscope camera. The identification was made based on the taxonomic keys of Ellis (1971), Sutton (1980), Hanlin (1997), Barnett and Hunter (1998) and Leslie and Summerell (2009).

In order for molecular identification, DNA was extracted from the mycelia of the cultures grown in PDA following the AP method (Sambrook and Russell, 2001). In a Techne® thermal cycler, model TC-512, the PCR analysis was carried out in order to amplify the internal regions in the ribosomal genes (rDNA) located between subunits 18S-5.8S-28S. The universal indicators ITS 4 (TCCTCCGCTTATTGATATG) and ITS 5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) were used, which were synthesized in the Instituto de Biotecnología of the UNAM. Each reaction mix contained 2.5 µL of buffer of 10X reaction, 1.25 µL of MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µL of dNTP's (Promega®), 1.0 µL of ITS 4, 1.0 µL of ITS 5, 0.5 of Taq DNA polymerase (Promega 5 µ/µL), 2.0 µL of DNA and 16.25 µL of injectable water to obtain a final volume of 25 µL (Innis *et al.*, 1990; Crous *et al.*, 2009). The amplification program was: initial denaturing temperature of 95 °C for 5 minutes, followed by 30 cycles at 95 °C for 45 seconds for the denaturing, 57 °C for 45 seconds for the hybridization and 72 °C for 1 minute for the extension and a final cycle of 72 °C for 5 minutes for the final extension and a final refrigeration temperature of 10 °C (Innis *et al.*, 1990; Crous *et al.*, 2009). The quality of the products of DNA extraction and PCR amplification



(Innis *et al.*, 1990; Crous *et al.*, 2009). El programa de amplificación fue: temperatura de desnaturalización inicial de 95 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos a 95 °C por 45 segundos para la desnaturalización, 57 °C por 45 segundos para la hibridación y 72 °C por 1 minuto para la extensión y un último ciclo de 72 °C por 5 minutos para la extensión final y una temperatura final de refrigeración de 10 °C (Innis *et al.*, 1990; Crous *et al.*, 2009). La calidad de los productos de extracción de DNA y amplificación de PCR se verificó con una electroforesis en gel de agarosa (Agarose LE Axygen®) al 1 %; para los productos de PCR se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder Promega®). La electroforesis se realizó en un First Light Illuminator UV a 90 V por 30 min. (Innis *et al.*, 1990; Crous *et al.*, 2009).

El producto obtenido de la amplificación se envió a secuenciar a Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias se editaron con el programa Gene Runner 5.0.33 Beta y se determinó la homología de la secuenciación en estudio con las bases de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information).

**Determinación de la incidencia de cálices enfermos.** La incidencia de cálices enfermos se evaluó usando el método propuesto por Campbell y Madden (1990) y se determinó de manera nominal (enfermo o sano), sin considerar la severidad de la enfermedad. Los síntomas de cálices considerados enfermos, podían presentar manchas sobre el cáliz o tizón en las puntas.

**Evaluación de condiciones de almacenamiento de los cálices** La humedad de los cálices almacenados se determinó de acuerdo al método 14.004 del AOAC (1984). Asimismo, se obtuvieron promedios mensuales de las variables temperatura, luminosidad y humedad relativa de cada uno de los

was verified with an electrophoresis in 1% agarose gel (Agarose LE axygen®); for the PCR products a 100 pb molecular weight marker was used (DNA Ladder Progema®). The electrophoresis was carried out in a First Light Illuminator UV at 90 V for 30 min. (Innis *et al.*, 1990; Crous *et al.*, 2009).

The product obtained from the amplification was sent to be sequenced at Macrogen Inc. (Seoul, Korea). The sequences were edited with the program Gene Runner 5.0.33 Beta and the homology of the sequencing in question was determined based on the data of the NCBI (National Center for Biotechnology Information).

**Determining the incidence of diseased calyxes.**

The incidence of diseased calyxes was evaluated using the method proposed by Campbell and Madden (1990) and it was determined in a nominal manner (diseased or healthy), without considering the severity of the disease. The symptoms of calyxes considered diseased could show up as spots on the calyx or smut at the tips.

**Evaluation of storage conditions of the calyxes.**

The humidity of the stored calyxes was determined according to method 14.004 of the AOAC (1984). Likewise, monthly averages were obtained for the following variables: temperature, luminosity and relative humidity from each of the sampled warehouses. The evaluated period was from December 2012 to May 2013, registering the values of each variable, every four hours with the aid of a Hobo Data Loggers U12.

**Data analysis.** With the data obtained from all the variables under study, analyses of variance were carried out with the SAS System version 9 software, and a comparison of measures was done using the Least Significant Difference (LSD) method with a significance level of 5 % (Steel *et*

almacenes muestreados. El periodo evaluado fue de diciembre de 2012 a mayo de 2013, registrando valores de cada variable, cada cuatro horas con la ayuda de un Hobo Data Loggers U12.

**Análisis de datos.** Con los datos obtenidos de todas las variables bajo estudio se realizaron análisis de varianza con el software The SAS System versión 9, y se realizó una comparación de medias mediante el método de Diferencia Mínima Significativa (DMS) con un nivel de significancia del 5% (Steel *et al.*, 1997). Además se realizó un análisis de correlación (Steel *et al.*, 1997) entre las variables temperatura, humedad relativa, luminosidad, humedad de cálices, incidencia de cálices enfermos, número de géneros aislados y su frecuencia con los datos observados de ambos almacenes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aun cuando la norma NMX-FF-115-SCFI-2010 clasifica un solo grado de calidad designado como *Flor (cáliz) deshidratada de jamaica*, se identificaron tres grados de calidad de mayor a menor: Extra, Suprema y Comercial. Dicha clasificación fue establecida por los acopiadores y está en función de la apariencia visual del producto y por tanto varía su valor económico en el mercado (Figura 1).

El 40.8 % de las muestras colectadas correspondió a la calidad Comercial, la cual presentó cálices rotos, color rojo oscuro, con presencia de manchas y/o tizón en las puntas, el 24.5 % fueron cálices de calidad Extra los cuales se observaron enteros, de color rojo intenso y limpios visualmente; la calidad Suprema es un grado intermedio que correspondió al 34.7 %.

**Identificación de hongos asociados a los cálices almacenados de jamaica.** De acuerdo a la

*al.*, 1997). In addition, a correlation analysis was done (Steel *et al.*, 1997) between the following variables: temperature, relative humidity, luminosity, humidity of the calyxes, incidence of diseased calyxes, isolated number of genera and their frequency with the data observed from both warehouses.

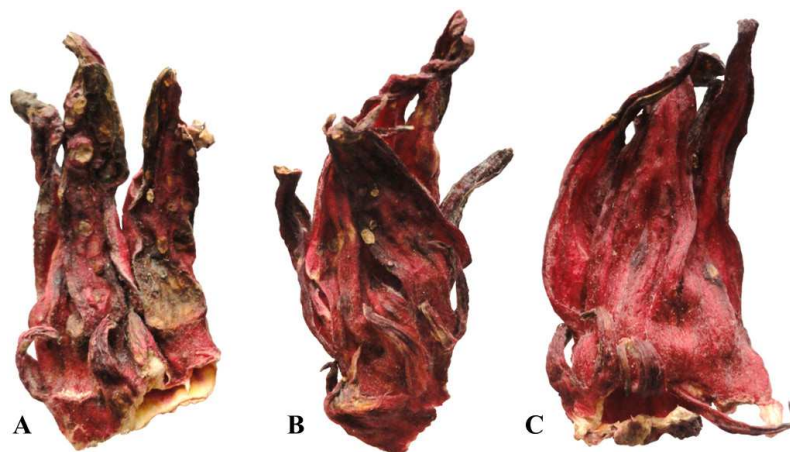
## RESULTS AND DISCUSSION

Even while the norm NMX-FF-115-SCFI-2010 classifies a sole quality level designated as *dried roselle flower (calyx)*, three quality levels were identified from greatest to least: Extra, Supreme and Commercial. Such classification was established by the collectors and is in function of the visual appearance of the product, therefore its economic value varies in the market (Figure 1).

40.8% of the collected samples corresponded to the Commercial quality, which presented broken calyxes, a dark red color, and showed spots and/or smut at the tips; 24.5% were calyxes of Extra quality which were observed whole, with an intense red color and visually clean; the Supreme quality is an intermediate level and corresponded to 34.7%.

**Identification of fungi associated with stored roselle calyxes.** According to the cultural and morphological characterization, 16 genera of fungi were isolated and identified as associated with dried and stored roselle calyxes, their identity and accumulated frequency are shown in figure 2. No significant difference was found in the frequency between *Aspergillus* when compared to *Alternaria* and *Nodulisporium*, though there was a significant difference between *Aspergillus* and the rest of the isolates.

Crous *et al.* (2009) mentioned that the most common genera that could be found dispersed in the

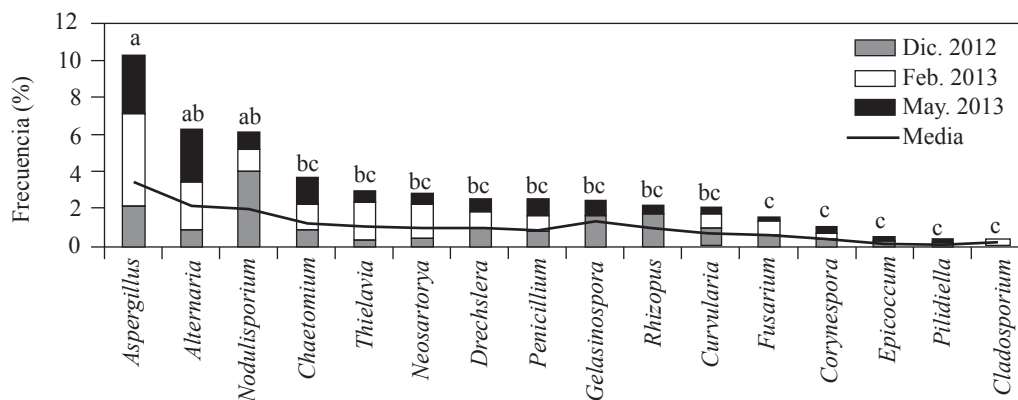


**Figura 1.** Calidad comercial de cálices de jamaica nacional A) Comercial B) Suprema C) Extra, colectados en Ayutla y Las Mesas, diciembre de 2012 - mayo de 2013.

**Figure 1.** Commercial quality of national roselle calyces A) Commercial B) Supreme C) Extra, collected in Ayutla and Las Mesas, December 2012 - May 2013.

caracterización cultural y morfológica se aislaron e identificaron 16 géneros de hongos asociados con cálices deshidratados y almacenados de jamaica, su identidad y frecuencia acumulada se muestra en la Figura 2. No se encontró diferencia significativa de la frecuencia entre *Aspergillus* al compararlo con *Alternaria* y *Nodulisporium*, pero si entre *Aspergillus* y el resto de los aislamientos.

air were *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Ulocladium* and *Wallemia*. On the other hand, in a study carried out by Essien *et al.* (2013), the following were frequently isolated from the spore atmosphere: *Curvularia*, *Drechslera*, *Nigrospora*, *Pithomyces* and *Stemphylium*. The



**Figura 2.** Frecuencia acumulada y media de los 16 géneros de hongos aislados en los diferentes periodos de muestreo.

**Figure 2.** Accumulated frequency and average of the 16 genera of fungi isolated in the different sampling periods.

Crous *et al.* (2009), mencionan que los géneros más comunes que se pueden encontrar dispersos en el aire son *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Ulocladium* y *Wallemia*, por otro lado, en un estudio realizado por Essien *et al.* (2013), se aislaron frecuentemente de la atmosfera esporas de *Curvularia*, *Drechslera*, *Nigrospora*, *Pithomyces* y *Stemphylium*. Lo anterior hace suponer que algunos de los géneros aislados en esta investigación pueden encontrarse de manera regular en el área de estudio. No obstante, algunos géneros han sido aislados también de cálices frescos aun sin cosechar, lo que apoya la teoría de que algunos hongos son acarreados desde el campo de cultivo.

La secuenciación de los amplicones confirmó la identificación de los organismos aislados, mediante un BLAST que arrojó  $\geq 97$  % de similitud con estudios realizados por otros autores y reportados en el GenBank, a excepción de *Neosartorya* que fue del 88 %. Por las características de fácil reconocimiento, *Rhizopus* y *Penicillium* solo se identificaron a nivel género con base en sus características culturales y morfológicas. El Cuadro 1, muestra el porcentaje de identidad con el BLAST de 14 géneros aislados de cálices de jamaica deshidratados y almacenados.

Se identificaron dos especies de *Chaetomium* y dos especies de *Fusarium*. Es importante mencionar que estudios filogenéticos demuestran que *Drechslera* ha sido aceptado dentro de las especies de *Curvularia* y *Bipolaris*, siendo sinónimo por tanto de *C. australiensis* y *B. australiensis*, respectivamente (Manamgoda *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2014).

El género más frecuentemente aislado fue *Aspergillus* y de acuerdo con Hedayati *et al.* (2007) y Adebayo-tayo y Samuel (2009), las esporas de *Aspergillus* pueden contaminar fácilmente el producto durante el deshidratado de los cálices, siendo

aforementioned supposes that some of the isolated genera in this investigation could be regularly found in the area of study. Nevertheless, some of the genera have also been isolated from fresh calyces yet to be harvested, which supports the theory that some of the fungi are carried from the field.

The sequencing of the amplicons confirmed the identification of the isolated organisms through a BLAST that produced a  $\geq 97$ % similarity with the studies done by other authors and reported in the GenBank, with the exception of *Neosartorya* which was 88%. Through the characteristics of easy recognition, *Rhizopus* and *Penicillium* were identified only at the genus level based on their cultural and morphological characteristics. Table 1 shows the identity percentage with the BLAST of 14 isolated genera of dried and stored roselle calyces.

Two species of *Chaetomium* and two species of *Fusarium* were identified. It is important to mention that phylogenetic studies show that *Drechslera* has been accepted within the species *Curvularia* and *Bipolaris*, therefore a synonym of *C. australiensis* and *B. australiensis*, respectively (Manamgoda *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2014).

The most frequently isolated genus was *Aspergillus* and according to Hedayati *et al.* (2007) and Adebayo-tayo and Samuel (2009), the spores of *Aspergillus* could easily contaminate the product during the drying process of the calyces, with relative humidity being the most important variable, this is attributed to its high frequency and again the post-harvest management plays an important role in the contamination of the product. Various authors have reported the presence of *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. rubrum*, *A. wentii* and yeast in beverages based on roselle extract (Owusu and Odamtten, 1999; Adebayo-tayo and Samuel, 2009), therefore it has not been ruled out that its presence could stem from storage practices.

**Cuadro 1.** Ubicación en el GenBank de 14 géneros de hongos obtenidos en cálices deshidratados y almacenados en centros de acopio de Ayutla y Las Mesas.

**Table 1.** Location in the GenBank of 14 genera of fungi obtained from dried calyxes stored in the collection centers in Ayutla and Las Mesas.

| Código de muestra | Id. Molecular                                                 | pb  | Comparación de la secuencia con el GenBank |            |
|-------------------|---------------------------------------------------------------|-----|--------------------------------------------|------------|
|                   |                                                               |     | Identidad                                  | Acceso     |
| R13               | <i>Aspergillus japonicus</i>                                  | 552 | 98 %                                       | KJ192202.1 |
| r4                | <i>Alternaria alternata</i>                                   | 574 | 99 %                                       | KJ739872.1 |
| R9                | <i>Nodulisporium</i> sp.                                      | 515 | 99 %                                       | JN635501.1 |
| N1                | <i>Chaetomium cupreum</i>                                     | 414 | 99 %                                       | KF668034.1 |
| R12               | <i>Chaetomium globosum</i>                                    | 519 | 98 %                                       | KJ528988.1 |
| N2                | <i>Thielavia terricola</i>                                    | 567 | 99 %                                       | GU966509.1 |
| R11               | <i>Neosartorya spinosa</i>                                    | 660 | 88 %                                       | EF669965.1 |
| R2                | <i>Curvularia australiensis</i>                               | 568 | 97 %                                       | KJ475805.1 |
| R8                | <i>Gelasinospora brevispora</i>                               | 585 | 99 %                                       | AY681196.1 |
| R3                | <i>Curvularia trifolii</i>                                    | 564 | 99 %                                       | KJ188716.1 |
| r8                | <i>Fusarium equiseti</i> ( <i>Gibberella intricans</i> )      | 540 | 99 %                                       | HM008677.1 |
| r5                | <i>Fusarium proliferatum</i> ( <i>Gibberella intermedia</i> ) | 541 | 99 %                                       | KJ439101.1 |
| r2                | <i>Corynespora cassiicola</i>                                 | 551 | 99 %                                       | KJ747095.1 |
| R6                | <i>Epicoccum nigrum</i>                                       | 540 | 99 %                                       | FJ424261.1 |
| R1                | <i>Pilidiella diplodiella</i>                                 | 562 | 98 %                                       | EU301051.1 |
| r1                | <i>Cladosporium cladosporioides</i>                           | 552 | 99 %                                       | KF938436.1 |

la humedad relativa la variable más importante, a esto se atribuye su alta frecuencia y nuevamente el manejo postcosecha juega un papel importante en la contaminación del producto. Varios autores han reportado la presencia de *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. rubrum*, *A. wentii* y levaduras en bebidas a base de extracto de jamaica (Owusu y Odamtten 1999; Adebayo-tayo y Samuel, 2009); por lo que no se descarta que su presencia provenga desde el almacenamiento.

Algunos organismos aislados, también son reportados por Owusu y Odamtten (1999), al evaluar la microflora de té de hierbas ghanés, compuesto de hojas secas de *Cinnamon*, *Hibiscus* y *Citronella*, donde aislaron 16 especies de hongos en *Hibiscus* pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Manoascus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Septodochium*, *Rhizopus* y *Syncephalastrum*. También

Some organisms isolated also reported by Owusu and Odamtten (1999) in evaluating the microflora of tea of Ghanaian herbs, composed of dried leaves of *Cinnamon*, *Hibiscus* and *Citronella*, where 16 fungi species isolated in *Hibiscus* belonging to the genera *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Manoascus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Septodochium*, *Rhizopus* and *Syncephalastrum*. They also determined samples in the field infected with *A. candidus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *C. cladosporioides*, *C. herbario*, *Penicillium digitatum*, *Syncephalastrum* spp. with the capacity to infect samples of dried leaves in storage. Furthermore, Omemu *et al.* (2006) found a total count of  $3.2 \times 10^4$  UFC/ml of fungi on dried roselle calyxes, isolating *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, *Rhizopus oligosporum*, *Mucor* spp., *A. flavus* and *Penicillium citrinum*. Other authors have isolated *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Trichoderma* sp., *Rhizopus stolonifera*,



determinaron muestras infectadas en campo con *A. candidus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *C. cladosporioides*, *C. herbario*, *Penicillium digitatum*, *Syncephalastrum* spp. con capacidad para infectar muestras de hojas secas en el almacén. Además, Omemu *et al.* (2006), encontraron una cuenta total de  $3.2 \times 10^4$  UFC/ml de hongos en cálices deshidratados de jamaica, aislando *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, *Rhizopus oligosporum*, *Mucor* spp., *A. flavus* y *Penicillium citrinum*. Otros autores han aislado *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Trichoderma* sp., *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium citrinum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Geotrichum* en bebidas a base de cálices de jamaica (Ojokoh *et al.*, 2002; Doughari y Elmahmood, 2008; Nwafor y Ikenebomeh, 2009). La consecuencia más notable de *Aspergillus* es la posible producción y acumulación de micotoxinas; es muy frecuente encontrar en productos agrícolas la presencia de aflatoxinas producidas por *A. flavus* y *A. parasiticus* y ocratoxinas producidas por *A. niger*, *A. ochraceus* y *A. carbonarius* (Perrone *et al.*, 2007). Battilani *et al.* (2003) reportaron *A. japonicus* como productor de ocratoxina A (OA) en cultivo de uvas, sin embargo, lo anterior no fue corroborado en estudios realizados por Parenicová *et al.* (2001), Samson *et al.* (2004) y Perrone *et al.* (2007). En el presente trabajo solo se determinó la identidad de los hongos asociados a cálices de jamaica deshidratados y almacenados, por lo que no se puede aseverar la presencia de alguna toxina en el producto como consecuencia de la presencia de los hongos aislados.

**Determinación de la incidencia en cálices enfermos.** Al comparar la incidencia media de cálices enfermos entre almacenes, no se encontró diferencia significativa entre Ayutla (60.5 %) y Las Mesas (48.6 %) (DMS=14.99); sin embargo, al compararla por fecha de colecta, en el mes de mayo de 2013

*Penicillium citrinum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Geotrichum* in beverages based on roselle calyxes (Ojokoh *et al.*, 2002; Doughari and Elmahmood, 2008; Nwafor and Ikenebomeh, 2009). The most notable consequence of *Aspergillus* is the possible production and accumulation of mycotoxins. The presence of aflatoxins produced by *A. flavus* and *A. parasiticus* and ochratoxins produced by *A. niger*, *A. ochraceus* and *A. carbonarius* are frequently found in agricultural products (Perrone *et al.*, 2007). Battilani *et al.* (2003) reported *A. japonicus* as the producer of ochratoxin A (OA) in the cultivation of grapes; however, the aforementioned was not corroborated in the studies carried out by Parenicová *et al.* (2001), Samson *et al.* (2004) and Perrone *et al.* (2007). In this work, only the identification of the fungi associated with dried and stored roselle calyxes was determined, therefore the presence of any toxin in the product cannot be asserted as a consequence of the presence of the isolated fungi.

**Determination of the incidence of diseased calyxes.** In comparing the average incidence of diseased calyxes between warehouses, no significant difference was found between Ayutla (60.5 %) and Las Mesas (48.6 %) (DMS=14.99); however, when compared by date of collection, in the month of May 2013, a greater average value (71.11 %) was obtained compared to the months of December 2012 (42.04%) and February 2013 (53.79 %) (DMS=16.5).

Meanwhile in Ayutla, no significant difference was found comparing the three dates of collection in the same warehouse; in Las Mesas a greater incidence was observed in May 2013 when compared to December 2012. When comparing the two warehouses, in December 2012 a greater incidence was observed in Ayutla. The aforementioned is attributed to the fact that in the first months of harvest, in the warehouse in

se obtuvo un valor medio mayor (71.11 %) comparado con los meses de diciembre de 2012 (42.04 %) y febrero de 2013 (53.79 %) (DMS=16.5).

Mientras que en Ayutla, no se encontró diferencia significativa al comparar las tres fechas de colecta en el mismo almacén, en Las Mesas se observó una incidencia mayor en mayo de 2013 comparado con diciembre de 2012. Al comparar los dos almacenes, en diciembre de 2012 se observó mayor incidencia en Ayutla. Lo anterior se atribuye a que durante los primeros meses de cosecha, en el almacén de Ayutla se almacenó jamaica en sus diferentes grados de calidad, mientras que en Las Mesas solo se recibió producto calidad Extra y Suprema en donde no se permite que haya cálices con necrosamiento. Sin embargo, ya para los meses de abril en adelante, que hay escases del producto, en Las Mesas también se recibió la calidad Comercial, consecuentemente, hubo la presencia de cálices con manchas, igualando la incidencia entre los dos almacenes.

La incidencia de cálices enfermos se determinó de manera nominal (enfermo o sano), por tanto un cáliz calidad Extra podría considerarse enfermo al igual que un cáliz calidad Comercial, aun cuando el primero presente apenas una pequeña mancha; lo anterior es poco confiable al momento de determinar la calidad del producto final, ya que el acopiador solo se basa en la apariencia visual y el criterio de selección varía entre acopiadores. El grado Comercial mostró una incidencia mayor de cálices enfermos (67.66 %) comparada con la calidad de mayor precio económico, la Extra (44.02 %) (DMS=17.276); lo anterior se atribuye al número de muestras colectadas por grado de calidad; es decir, fue más frecuente encontrar cálices manchados y/o con tizón en las puntas (40.8 %) que cálices sanos (24.5 %). La media del número de géneros de hongos aislados en cálices con diferente grado de calidad no mostró una diferencia significativa,

Ayutla, roselle was stored in its different quality grades, meanwhile, in Las Mesas only product with Extra and Supreme quality was received where no calyxes with necrosing were allowed. However, for the months of April onward, in which there was a product shortage, Las Mesas also received Commercial quality, and consequently there was the presence of calyxes with spots, matching the incidence between the two warehouses.

The incidence of diseased calyxes was determined in a nominal manner (diseased or healthy), therefore a calyx of Extra quality could be considered as diseased in the same manner as a Commercial quality calyx, even when the former barely shows a small spot. The aforementioned is unreliable at the time of determining the quality of the final product, given that the collector only bases on the visual appearance and the selection criteria varies between collectors. The Commercial grade showed a greater incidence of diseased calyxes (67.66%) compared to the quality of greater economical price, Extra (44.02%) (DMS=17.276). The aforementioned is attributed to the number of samples collected by quality grade, that is to say, it was more frequent to find calyxes with spots and/or smut on the tips (40.8%) than healthy calyxes (24.5%). The average number of genera of fungi isolated in calyxes with different quality grades did not show a significant difference, this is related to the visual criteria of the collectors at the time of classifying the Commercial qualities of roselle and the aforementioned consideration.

The statistical analysis, with a 5% level of significance, did not indicate differences between warehouses, in the number of isolated genera (11.6 for both warehouses, DMS=4.719) and their frequency (9.9 % and 5.8 % for Ayutla and Las Mesas, respectively, DMS=4.7405); however, by increasing the level of significance to 10 % a significant difference was found in the frequency of

lo anterior se relacionó con el criterio visual de los acopiadores al momento de clasificar las calidades comerciales de jamaica y con la consideración hecha anteriormente.

El análisis estadístico, con un nivel de significancia del 5 %, no indicó diferencia entre almacenes, en el número de géneros aislados (11.6 para ambos almacenes, DMS=4.719) y su frecuencia (9.9 % y 5.8 %, para Ayutla y Las Mesas, respectivamente, DMS=4.7405); sin embargo, al aumentar el nivel de significancia a 10 % se encontró una diferencia significativa en la frecuencia de los géneros aislados entre Ayutla y Las Mesas (DMS=3.6399); esta diferencia se atribuye a los grados de calidad recibidos en cada almacén y al manejo postcosecha dentro de los mismos, ya que en Ayutla, fue común observar la recepción de cálices calidad Comercial, el almacenamiento se realiza por mayor tiempo en cúmulos a granel, compartiendo el mismo espacio para los diferentes grados de calidad, aunado a esto, la humidificación y traspaleo constante del producto favorece que las esporas liberadas se distribuyan fácilmente en el aire, y de acuerdo con Omemu *et al.* (2005) y Adebayo-tayo y Samuel (2009), pueden caer sobre el producto para dañarlo posteriormente.

#### **Evaluación de condiciones de almacenamiento.**

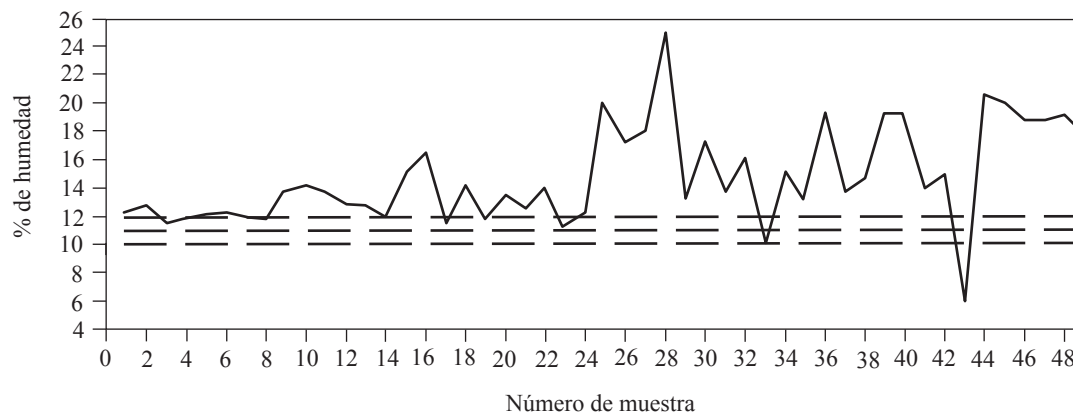
En cuanto al porcentaje de contenido de humedad promedio de cálices, no se determinó diferencia significativa entre las muestras colectadas en Las Mesas (15.0 %) y Ayutla (14.5 %) (DMS=2.0656). La Figura 3 muestra la humedad determinada para las 49 muestras procesadas y su ubicación respecto a los límites que establece la NMX-FF-115-SCFI-2010. El 81.63% de las muestras reportaron un contenido de humedad mayor al 12 %; condición que favorece el desarrollo de hongos durante el almacenamiento (Augustburger, 2000); además Gradinaru *et al.* (2003) y Galicia *et al.* (2008),

the isolated genera between Ayutla and Las Mesas (DMS=3.6399). This difference is attributed to the quality grades received in each warehouse and to the post-harvest management between the same. Given that in Ayutla it was common to observe the reception of Commercial quality calyxes, storage was carried out for a greater amount of time in bulk hosts, sharing the same space for the different quality grades. In conjunction with this, the humidification and the constant shoveling of the product favors that the spores released are easily distributed in the air, and according to Omemu *et al.* (2005) and Adebayo-tayo and Samuel (2009), that could fall on the product to damage it afterwards.

**Evaluation of the storage conditions.** Regarding the percentage of the average humidity content of calyxes, no significant difference was determined between the samples collected in Las Mesas (15.0 %) and Ayutla (14.5 %) (DMS=2.0656). Figure 3 shows the humidity determined for the 49 processed samples and their location regarding the limits established by the NMX-FF-115-SCF-2010. 81.63% of the samples reported a humidity content greater than 12%, a condition that favors the development of fungi during storage (Augustburger, 2000); in addition, Gradinaru *et al.* (2003) and Galicia *et al.* (2008) mention that this factor also affects the stability of the color of the calyxes, given that it increases the reaction velocities of the degradation of Anthocyanins, a component responsible for the coloration of the calyxes.

When comparing the humidity content of the calyxes by date of collection, it was significantly determined that in both warehouses the more humid calyxes were collected in the months of February and May 2013 (Figure 4).

The variations in the percentage of humidity in the product between the different sampling dates



**Figura 3.** Humedad de cálices de jamaica almacenados; la secuencia de las muestras corresponde al orden de colecta. Las líneas punteadas corresponden a los valores, mínimo, medio y superior establecidos por la NMX-FF-115-SCFI-2010.

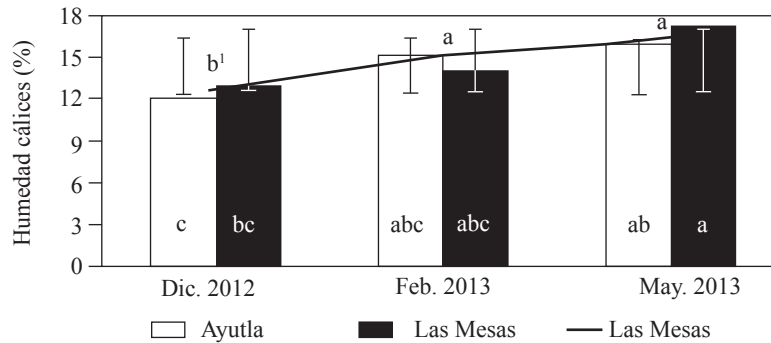
**Figure 3.** Humidity of the stored roselle calyces; the sequence of the samples corresponds to the collection order. The dotted lines correspond to the values, minimum, medium and maximum established by the NMX-FF-115-SCFI-2010.

mencionan que este factor repercute también en la estabilidad del color de los cálices, ya que incrementa las velocidades de reacción de degradación de antocianinas, componente responsable de la coloración de los cálices.

Al comparar el contenido de humedad de los cálices por fecha de colecta, en ambos almacenes se determinó significativamente que los cálices más húmedos se colectaron en los meses de febrero y mayo de 2013 (Figura 4).

Las variaciones en el porcentaje de humedad del producto entre las diferentes fechas de muestreo se debe a las prácticas postcosecha que se realizan en cada almacén; generalmente el acopio de los cálices se realiza en los meses de noviembre y diciembre, poco después de que el productor los ha deshidratado y envasado; mientras que en los meses más calurosos el producto ya se encuentra en el almacén y se asperja con agua para evitar que se quiebre y pierda peso, lo anterior ocasiona que los cálices reabsorban humedad (Juliani *et al.*, 2009). Vallecillo y Gómez (2004) mencionan que de las condiciones de almacenamiento y manejo del producto depende que la jamaica no reabsorba humedad del ambiente

are due to the post-harvest practices that are carried out in each warehouse; generally, the collection of the calyces is carried out in the months of November and December, shortly after the producer has dried and packaged them. Meanwhile, in the hotter months the product is already in storage and sprayed with water in order to avoid it breaking and losing weight, which causes the calyces to reabsorb humidity (Juliani *et al.*, 2009). Vallecillo and Gómez (2004) mention that the storage conditions and the management of the product depend on the roselle not reabsorbing humidity from the ambiente and favoring the growth of fungi, which results in it being necessary to design and evaluate practices that inhibit this condition. During the material gathering, the average temperature that was registered in Las Mesas was greater (27.6 °C) than that of Ayutla (27.1 °C) (DMS=0.162), while the relative humidity in Ayutla was greater (58.4 %) compared to Las Mesas (52.4 %) (DMS=0.8993). The luminosity of Las Mesas was greater (38.3 lux) than the luminosity of Ayutla (16.8 lux) (DMS=4.5752). The collection center of Ayutla is located at an altitude of 391 m above sea level and



**Figura 4.** Humedad promedio de cálices en diferentes periodos de muestreo. <sup>1</sup>Medias con la misma letra dentro de línea y dentro de barras son estadísticamente iguales (DMS entre almacenes,  $P < 0.05 = 3.3361$ ; DMS media,  $P < 0.05 = 2.2185$ ).

**Figure 4.** Average humidity of the calyxes in different sampling periods. <sup>1</sup>Averages with the same letter inside the line and within the bars are statistically the same (DMS between warehouses,  $P < 0.05 = 3.3361$ ; DMS average,  $P < 0.05 = 2.2185$ ).

y favorezca el crecimiento de hongos, por lo que resulta necesario diseñar y evaluar prácticas que inhiban esta condición.

Durante la colecta de material, la temperatura media que se registró en Las Mesas fue mayor ( $27.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) que la de Ayutla ( $27.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (DMS=0.162); mientras que la humedad relativa en Ayutla fue mayor (58.4 %) comparada con Las Mesas (52.4 %) (DMS=0.8993). La luminosidad de Las Mesas fue mayor (38.3 lux) que la luminosidad de Ayutla (16.8 lux) (DMS=4.5752). El centro de acopio de Ayutla se ubica a una altitud de 391 msnm y el almacén de Las Mesas a 432 msnm.

Augustburger *et al.* (2000) recomiendan almacenar el producto empacado en bolsas de polietileno, polipropileno o cajas de cartón en espacios protegidos del sol a temperaturas máximas de  $15\text{--}20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una humedad ambiental máxima de 60% y bajo estas condiciones el producto puede conservarse por 12 a 18 meses.

Las condiciones de almacenamiento que se practican en la zona de estudio difieren de las recomendaciones de Augustburger *et al.* (2000); ya que el producto se almacena en su mayoría en cúmulos a granel a temperatura ambiente, la cual registró un

the warehouse of Las Mesas at 432 m above sea level.

Augustburger *et al.* (2000) recommends storing the product packaged in polyethylene or polypropylene bags or cardboard boxes in spaces protected from the sun at maximum temperatures of  $15\text{--}20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and a maximum ambient humidity of 60% and under these conditions the product could be preserved for up to 12 to 18 months.

The storage conditions used in the zone of study differ from those recommended by Augustburger *et al.* (2000); given that the product is mostly stored in bulk hosts at ambient temperature, which had an average registered value of up to  $28.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ , while the relative humidity registered values of up to 66.4 % in Ayutla. According to Arauz (1998), the majority of the pathogenic fungi sporulate better in high relative humidity than at low levels. The variation in the luminosity was related to the conditions of the very facilities, the collection volume and the post-harvest practices that are used in each warehouse; however, the light influence on the development of the diseases, in particular in natural conditions, has a lesser importance than that of the temperature or the humidity.



valor medio de hasta 28.6 °C, mientras que la humedad relativa registró valores hasta de 66.4 % en Ayutla; de acuerdo a Arauz (1998), la mayoría de los hongos patógenos esporulan mejor a humedades relativas altas que a niveles bajos. La variación en la luminosidad se relacionó con las condiciones propias de las instalaciones, el volumen de acopio y las practicas postcosecha que se practican en cada almacén; sin embargo, la influencia de la luz sobre el desarrollo de enfermedades, en particular en condiciones naturales, tiene una importancia mucho menor que la que tiene la temperatura o la humedad.

Se realizó un análisis de correlación entre las variables: temperatura, humedad relativa, luminosidad, humedad de cálices, incidencia de cálices enfermos, número de géneros aislados y frecuencia de géneros aislados. Los coeficientes de correlación de las variables de almacenamiento de ambos almacenes, se presentan en el Cuadro 2.

Se determinó una correlación negativa muy alta entre la temperatura y la humedad relativa. Así, Arauz (1998) menciona que una influencia indirecta de la temperatura en el desarrollo de patógenos es su efecto en la humedad; conforme aumenta la

A correlation analysis was carried out between the variables: temperature, relative humidity, luminosity, humidity of the calyxes, incidence of diseased calyxes, number of isolated genera and frequency of the isolated genera. The correlation coefficients of the storage variables of both warehouses are shown in table 2.

A rather high negative correlation was determined between the temperature and relative humidity. Similarly, Arauz (1998) mentions that an indirect influence of the temperature on the development of pathogens is its effect on humidity; as the temperature increases, the relative humidity decreases and the foliar surfaces dry faster.

On the other hand, the storage temperature and the humidity of the calyxes showed a low positive correlation, by increasing the temperature the humidity of the stored calyxes also increased, this is due to it decreasing the relative humidity, the calyxes continue to dry and the collectors spray the product with water during its stay at the collection centers in order to facilitate their management and avoid weight loss, therefore, as it has already been mentioned, the calyxes can reabsorb humidity (Juliani *et al.*, 2009).

**Cuadro 2.** Coeficientes de correlación entre las variables de almacenamiento evaluadas en Ayutla y Las Mesas.

**Table 2.** Correlation Coefficients between the storage variables evaluated in Ayutla and Las Mesas.

| Variabes | Temp          | HR            | Lum    | Hum-cal | Inc    | Ngén          | Frec  |
|----------|---------------|---------------|--------|---------|--------|---------------|-------|
| Temp     | 1.000         |               |        |         |        |               |       |
| HR       | <i>-0.967</i> | 1.000         |        |         |        |               |       |
| Lum      | <i>0.449</i>  | <i>-0.449</i> | 1.000  |         |        |               |       |
| Hum-cal  | <i>0.352</i>  | <i>-0.419</i> | 0.086  | 1.000   |        |               |       |
| Inc      | <i>0.281</i>  | <i>-0.326</i> | -0.113 | 0.149   | 1.000  |               |       |
| Ngén     | -0.040        | 0.015         | -0.182 | -0.083  | 0.049  | 1.000         |       |
| Frec     | -0.168        | 0.202         | -0.024 | -0.182  | -0.036 | <i>-0.349</i> | 1.000 |

Las correlaciones en cursivas indican una diferencia significativa de P<0.05. Temp= Temperatura, HR=Humedad relativa, Lum=Luminosidad, Hum-cal=Humedad de cálices, Inc=Incidencia de cálices enfermos, Ngén=Número de géneros aislados, Frec=Frecuencia de géneros aislados / The correlations in italic show a significant difference of P< 0.05. Temp= Temperature, HR=Relative humidity, Lum=Luminosity, Hum-cal=Humidity of the calyxes, Inc=Incidence of diseased calyxes, Ngén=Number of isolated genera, Frec=Frequency of the isolated genera.

temperatura, la humedad relativa disminuye y más rápidamente se secan las superficies foliares.

Por otro lado, la temperatura de almacenamiento y la humedad de los cálices mostraron una correlación positiva baja, al aumentar la temperatura también aumenta la humedad de los cálices almacenados, esto se debe a que disminuye la humedad relativa, se siguen deshidratando los cálices y los acopiadores asperjan con agua el producto durante su permanencia en los centros de acopio para facilitar su manejo y evitar pérdidas de peso, por lo que, como ya se mencionó, los cálices pueden reabsorber humedad (Juliani *et al.*, 2009).

La correlación positiva baja entre la temperatura y la incidencia de cálices enfermos se atribuye a las prácticas postcosecha, donde se debe evitar que el producto no vuelva a absorber humedad del ambiente, lo que favorecería el crecimiento de hongos (Vallecillo y Gómez, 2004) y por tanto aumentaría la incidencia de cálices enfermos.

Al aumentar la temperatura aumenta la luminosidad de almacenamiento, esta correlación positiva moderada, depende del diseño y/o prácticas postcosecha propias de cada almacén, sin embargo, la luminosidad es un factor de menor importancia para el desarrollo de enfermedades.

El número de géneros aislados mostró una correlación negativa baja con su frecuencia acumulada, esto se atribuye a la clasificación visual de las calidades que realizan los acopiadores al momento de recibir la jamaica, mismas que no están basadas en criterios científicos; ya que podría recibirse un cáliz aparentemente sano, calidad extra y éste estar contaminado superficialmente con esporas presentes en el aire.

La jamaica es un producto no perecedero, que requiere de cuidados para conservar su estado natural después de la cosecha. El proceso de deshidratación de los cálices debe ser rápido para evitar enmohecimiento, y de esta manera el producto se

The low positive correlation between the temperature and the incidence of diseased calyxes is attributed to the post-harvest practices, where it must be avoided for the product to reabsorb ambient humidity, which would favor the growth of fungi (Vallecillo and Gómez, 2004) and therefore the incidence of diseased calyxes would increase.

By increasing the temperature, the luminosity of the storage increases. This moderate positive correlation depends on the design and/or post-harvest practices of each warehouse; however, the luminosity is a factor of lesser importance for the development of diseases.

The number of isolated genera showed a low negative correlation with its accumulated frequency, this is attributed to the visual classification of the qualities, which is carried out by the collectors at the time of receiving the roselle, and which is not based on scientific criteria; given that an apparently healthy calyx could be received, of Extra quality, and this same calyx could be superficially contaminated with spores found in the air.

Roselle is a non-perishable product, which requires certain instructions to conserve its natural state after harvest. The drying process of the calyxes must be fast in order to avoid mildew, and in this fashion the product is stored at a humidity below 12%, with adequate ventilation.

## CONCLUSIONS

The average humidity content of the analyzed roselle samples was 14.5% above what is technically recommended by various authors, including what is established in the NMX-FF-115-SCF-2010; this favored the development of fungi. 81.63% of the samples exceeded the upper limit established by the accepted humidity content for its commercialization.

almacene con una humedad menor al 12 %, con una adecuada ventilación.

## CONCLUSIONES

La media de contenido de humedad de las muestras analizadas de jamaica fue de 14.5 %, superior a lo técnicamente recomendado por varios autores, incluyendo lo establecido en la NMX-FF-115-SCFI-2010; esto favoreció el desarrollo de hongos. El 81.63 % de las muestras superó el límite superior establecido para el contenido de humedad aceptado para su comercialización.

La incidencia de cálices enfermos fue mayor en el mes de mayo de 2013 (71.11 %) comparada con los meses de diciembre de 2012 (42.04 %) y febrero de 2013 (53.79 %). No se encontró diferencia significativa en la incidencia de cálices enfermos colectados en los almacenes de Ayutla (60.5 %) y Las Mesas (48.6 %). Asimismo, los cálices calidad Comercial mostraron una incidencia mayor que los cálices de calidad Extra.

Se aislaron 16 géneros de hongos asociados a los cálices deshidratados y almacenados de jamaica; los 5 géneros aislados más frecuentemente fueron *Aspergillus*, *Alternaria*, *Nodulisporium*, *Chaetomium* y *Thielavia*.

Con un  $\alpha=0.1$  se determinó diferencia significativa en la frecuencia acumulada de éstos hongos aislados entre almacenes, la principal causa de la diferencia se debe a las prácticas de manejo que se realizan en cada almacén.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, permitieron conocer las condiciones bajo las que se almacena la jamaica cosechada y deshidratada en Guerrero, mismas que deben corregirse para evitar el favorecimiento de la presencias de los organismos identificados.

The incidence of diseased calyces was greater in the month of May 2013 (71.11 %) compared to the months of December 2012 (42.04 %) and February 2013 (53.79 %). No significant difference was found in the incidence of diseased calyces collected in the warehouses in Ayutla (60.5 %) and Las Mesas (48.6 %). Likewise, the Commercial quality calyces showed greater incidence than the calyces of Extra quality.

16 genera of fungi associated with the dry and stored roselle calyces were isolated; the 5 most frequently isolated genera were *Aspergillus*, *Alternaria*, *Nodulisporium*, *Chaetomium* and *Thielavia*.

Considering  $\alpha=0.1$ , a significant difference in the accumulated frequency of this fungi was determined between warehouses. The main cause of the difference is due to the management practices used in each warehouse.

The obtained results in this study allowed knowledge of the conditions under which the harvested and dried roselle are stored in Guerrero, which must be corrected to avoid favoring the presence of the identified organisms.

### Acknowledgements.

To the Sectorial Fund SAGARPA-CONACYT for financing the project with key-163972

~~~~~ Finaliza la versión en Inglés ~~~~~

Agradecimientos

Al Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT por el financiamiento del proyecto con clave-163972.

LITERATURA CITADA

Adebayo-tayo BC and Samuel UA. 2009. Microbial quality and proximate composition of dried Hibiscus sabdariffa calyces

- in Uyo, Eastern Nigeria. *Malaysian Journal of Microbiology* 5 (1): 13-18.
- Arauz CLF. 1998. Fitopatología un enfoque agrocológico. Primera Edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, C.R. pp. 201-228
- Association of Official Analytical Chemist Inc. (AOAC). 1984. Official methods of analysis. Twelfth Edition. St. Paul. Minnesota, USA.
- Augustburger F, Berger J, Censkowsky U, Heid P, Milz J, y Streit C. 2000. Agricultura orgánica en el trópico y subtropico. Guía de 18 cultivos. Hibisco. Asociación Naturland. Primera Edición. Gräfelfing, Alemania. 13p.
- Barnett HL and Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA. 218p.
- Battilani P, Pietri A, Bertuzii T, Languasco L, Giorni P and Kozakiewicz Z. 2003. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection* 66 (4): 633-636.
- Campbell C and Madden LV. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. Jhon Wiley and Son. New York, USA. 532p.
- Crous PW, Verkley GJM, Groenewald JZ and Samson RA. 2009. Fungal Biodiversity. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht. The Netherlands. 269p.
- Deng H, Pei TP, Shivas RG and Chon NY. 2014. *Curvularia tsudae* comb. nov. et nom. nov., formerly *Pseudocochliobolus australiensis*, and a revised synonymy for *Curvularia australiensis*. *Mycoscience* XXX: 1-5.
- Doughari JH, Alabi G, and Elmahmood AM. 2007. Effect of some chemical preservatives on the shelf-life of sobo drink. *African Journal Microbiology Research* 2: 037-041.
- Ellis MB. 1971. More Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, UK. 507p.
- Essien BC, Taiga A, Suleiman, MN, Idachaba SO, Aniama SO and Edegbo E. 2013. A study of airborne fungal spores of Anyigba, Kogi state, Nigeria. *American Journal of Biomedical and Life Science* 1 (49): 70-74.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2004. Hibiscus: Post-production management for improved market access. operation. 19 p. http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compndium_-_Hibiscus.pdf (consulta, mayo 2014).
- Galicia FLA, Salinas MY, Espinoza GBM y Sánchez FC. 2008. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14 (2): 121-129.
- Gradinaru G, Biliaderis CG, Kallithraka S, Kefalas P and Garcia-Viguera C. 2003. Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and solid state: effects of copigmentation and glass transition. *Food Chemistry* 83: 423-436.
- Hanlin RT. 1997. Illustrated genera of Ascomycetes. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA. 263p.
- Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P and Denning DW. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153: 1677-1692.
- Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ and White TJ. 1990. PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press. San Diego, USA. 482p.
- Juliani HR, Welch CR, Wu Q, Diouf B, Malainy D and Simon JE. 2009. Chemistry and quality of hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for developing the natural-product industry in Senegal. *Journal of Food Science: Sensory and Food Quality* 74(2): 113-121.
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 388p.
- Manamgoda DS, Cai L, McKenzie EHC, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E, Shivas RG, Tan YP and Hyde KD. 2012. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris - Cochiobolus - Curvularia* complex. *Fungal Diversity* 56: 131-144.
- McClintock NC and El Tahir IM. 2004. *Hibiscus sabdariffa* L. In: Grubben GJH and Denton OA PROTA 2: Vegetable/Légumes. PROTA, Wageningen, Netherlands. http://database.prota.org/PROTAhtml/Hibiscus%20sabdarriffa_En.htm (consulta, junio 2014).
- Norma Mexicana MX-FF-115-SCFI-2010. Productos Agrícolas destinados para consumo humano –flor (cáliz) de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) – especificaciones y métodos de prueba. 21p.
- Nwafor OE and Ikenebomeh MJ. 2009. Effects of different packaging materials on microbiological, physio-chemical and organoleptic quality of zobo drink storage at room temperature. *African Journal of Biotechnology* 8 (12): 2848-2852.
- Ojokoh AO, Adeyuti FC, Akinyosoye FA and Oyetayo VO. 2002. Fermentation studies on roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyces neutralised with trona. *The Journal of Food Technology in Africa* 7 (3): 75-78.
- Omemu AM, Edema MO, Atayese AO and Obadina AO. 2006. A survey of the microflora of *Hibiscus sabdariffa* (roselle) and the resulting “zobo” juice. *African Journal of Biotechnology* 5 (83): 254-259.
- Owusu E and Odamtten GT. 1999. Quality of Ghana herbal tea: microflora and control measures. *Journal of the Ghana Science Association* 1 (3): 84-99.
- Parenicová L, Skouboe P, Frisvad J, Samson RA, Rossen L, Hoor-Suykerbuyk H and Visser J. 2001. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (29): 521-527.
- Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J, Frisvad JC, Meijer M, Mahakarnchanakul W and Samson RA. 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology* 59: 53-66
- Sambrook J and Russell DW. 2012. Molecular cloning. A Laboratory Manual. Third Edition. 1. 1.32-1.34. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.
- Samson RA, Houbraken JAMP, Kuijpers AFA, Frank JM and Frisvad JC. 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology* 50: 45-61.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2012. Anuario estadístico de la producción agrícola. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/> (consulta, mayo 2014).

Steel RGD, Torrie JH and Dickey DA. 1997. Principles and procedures of statistics a biometrical approach. 3th Edition. McGraw-Hill. USA. 139-201; 286-290.

Sutton BC. 1980. The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidio, acervuli and stroma. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 696p.

Vallecillo SMS y Gómez E. 2004. Cultivo de Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L). Programa de Política Económica y Desarrollo de Agronegocios, IICA USAID, Primera Edición. Editarte. Managua. 50 p.

Etiología y evaluación de alternativas de control de la marchitez del chile de árbol (*Capsicum annuum* L.) en La Vega de Metztlán, Hidalgo, México

Etiology and evaluation of control alternatives for wilt in chile de arbol (*Capsicum annuum* L.) in La Vega, Metztlán, Hidalgo, México

Nanci Lozano Alejo¹, Remigio A. Guzmán-Plazola^{1,2*}, Emma Zavaleta Mejía¹, Víctor Heber Aguilar Rincón², Victoria Ayala Escobar¹. ¹Programa de Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología y ²Programa de Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco. CP 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México. *Correspondencia: rguzmanp@colpos.mx.

Recibido: Noviembre 20, 2014

Aceptado: Diciembre 13, 2014

Lozano Alejo N, Guzmán-Plazola RA, Zavaleta Mejía E, Aguilar Rincón VH y Ayala Escobar V. 2015. Etiología y evaluación de alternativas de control de la Marchitez del chile de árbol (*Capsicum annuum* L.) en La Vega de Metztlán, Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 31-53.

Resumen. La marchitez y muerte de plantas de chile de árbol en la Vega de Metztlán, Hidalgo (VMH), está causando grandes pérdidas de rendimiento en la región. En el presente trabajo se determinó la etiología de esta enfermedad y se evaluaron alternativas de control de disponibilidad inmediata (resistencia de diez cultivares de chile de árbol y eficacia de productos químicos y biológicos disponibles en el mercado nacional), como un primer paso hacia el manejo integrado del problema. Aunque *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* fueron también aislados de plantas enfermas, sólo *Phytophthora capsici* reprodujo los síntomas de la enfermedad. Los cultivares CP 1261, CP 1264 y CP 1305 mostraron los mayores niveles de resistencia a la enfermedad. Aplicaciones recurrentes de me-

Abstract. Wilt and death of chile de árbol plants in “La Vega de Metztlán”, Hidalgo (VMH) are causing important yield losses in the region. In this work, the etiology of this disease was determined and immediate available control alternatives were evaluated (resistance of ten chile de árbol cultivars and efficiency of chemical and biological products available in the national market) as the first step to the integrated management of the problem. *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* were isolated from diseased plants; however, only *Phytophthora capsici* duplicated the symptoms of the disease. The CP 1261, CP 1264 and CP 1305 cultivars showed the highest resistance levels to the disease. The repeated application of metalaxyl, fosetyl-aluminum or propamocarb, metalaxyl alternated with fosetyl-aluminum or with propamocarb, exerted total wilt control. Even though metam sodium controlled the disease in the majority of the cases, it proved to be phytotoxic. Among the natural alternatives, Baktillis (*Bacillus subtilis*), administered on its own or as the combination of Fus Out (*Trichoderma harzianum*) with Probac (*Bacillus subtilis*), both reduced the

talaxil, fosetil aluminio o propamocarb, metalaxil alternado con fosetil aluminio o con propamocarb tuvieron un control total de la marchitez. El metam sodio aunque controló la enfermedad en la mayoría de los casos, resultó fitotóxico. De los biológicos, Baktillis (*Bacillus subtilis*) aplicado sólo o la combinación de Fus Out (*Trichoderma harzianum*) con Probac (*Bacillus subtilis*) redujeron la severidad de la enfermedad, pero no impidieron la infección por el patógeno.

Palabras clave: Resistencia, control químico, control biológico de *Phytophthora capsici*.

El chile de árbol (*Capsicum annuum* L) es una especie de reciente introducción en la Vega de Metztlán, Hidalgo (VMH), donde es afectado por problemas de marchitez y muerte de plantas, cuya incidencia-severidad es cada vez más alta, al grado de causar pérdidas de rendimiento de hasta 100 %. A la fecha no se han publicado reportes sobre la etiología de esta enfermedad en la región ni sobre estrategias para su manejo. Los agricultores de la región utilizan indiscriminadamente productos químicos sugeridos por los comercializadores locales de plaguicidas; en la mayoría de los casos sin éxito y con el consecuente aumento en los costos de producción y pérdidas económicas que conducen al abandono del cultivo. La marchitez y muerte de plantas de chile generalmente está asociada con la infección radical por hongos de los géneros *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* y *Fusarium* (Velásquez *et al.*, 2001). Aunque se han probado alternativas de control cultural, genético, químico y biológico, el éxito en el manejo de la enfermedad es en general variable, dependiendo de las condiciones del cultivo, genotipos de cultivo, de los patógenos involucrados y características de los suelos, entre otros factores (Ristaino y Johnston, 1999; Granke *et al.*, 2012), lo cual hace necesario definir

severity of the disease, but did not prevent the infection by the pathogen.

Key words: Resistance, chemical control, biological control of *Phytophthora capsici*.

The chile de árbol (*Capsicum annuum* L) is a recently introduced species in Vega, Metztlán, Hidalgo (VMH), where it is affected by wilt and plant death problems, the incidence-severity of which is increasingly higher, to the point of having caused a yield loss of up to 100 %. To this date, there are no published reports about the etiology of this disease in the region, or the strategies for its management. Farmer of the region indiscriminately use chemical products that have been suggested by the local pesticide sellers; in most cases these are unhelpful and result in the abandonment of the crops. The wilt and death of chili plants are generally associated with the root fungal infection of *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* and *Fusarium* genera (Velásquez *et al.*, 2001). Even though cultural, genetic, chemical and biological control alternatives have been tried, the success in the management of the disease is usually variable, depending on the conditions of the crop, cultivar genotype and the pathogens involved and the characteristics of the soil, among other factors (Ristaino and Johnston, 1999; Granke *et al.*, 2012), which makes it necessary to define specific control measures for each region. Once the etiology of a plant health problem has been determined, it is necessary to access the most easily available control resources while an integral management program is designed, in order to offer immediate alternatives to the producers. Generally, the first choice resource is the evaluation of the resistance or tolerance of crop genotypes and of the available and authorized chemical and biological commercial products in the market. In this work, in addition to

medidas de control específicas para cada región. Una vez determinada la etiología de un problema fitosanitario, en tanto se diseña un programa integral de manejo se hace necesario recurrir a los recursos de control más fácilmente disponibles, para poder ofrecer alternativas inmediatas a los productores. La evaluación de la resistencia o tolerancia de genotipos del cultivo y de los productos químicos y biológicos comerciales autorizados disponibles en el mercado es generalmente el primer recurso de elección. En el presente trabajo además de determinar la etiología del agente causal de la marchitez y muerte del chile en la VMH, se realizó una evaluación, en suelos de la VMH, de la resistencia a la marchitez de cultivares de chile de árbol colectados en diferentes partes de la República Mexicana y de la efectividad de los productos químicos y biológicos disponibles en el mercado nacional, así como diferentes esquemas de alternancia enfocados a reducir riesgos de resistencia.

MATERIALES Y METODOS

Esta investigación fue realizada bajo condiciones de invernadero, con el fin de reducir los problemas asociados a la variabilidad del suelo y a la distribución espacial del patógeno, factores frecuentemente observables en fitopatógenos del suelo (Larkin *et al.*, 1995; Gumpertz *et al.*, 1997), particularmente cuando se maneja un número alto de tratamientos.

Aislamiento, identificación y pruebas de patogenicidad de los organismos asociados a la marchitez del chile. Se colectó suelo rizosférico y plantas de chile de árbol (*Capsicum annuum* L) con síntomas de marchitez en tres localidades de la VMH. Los tallos y las raíces se desinfectaron superficialmente de acuerdo a lo descrito por Silva-Rojas *et*

determining the etiology of the causative agent of wilt and death of the chile in VMH, an evaluation was performed, in VMH soil, of the wilt resistance of chile de árbol cultivars collected from different parts of the Mexican Republic and of the efficiency of the chemical and biological products available in the national market, as well as of different alternation patterns focused on the reduction of resistance risks.

MATERIALS AND METHODS

This investigation was carried out under greenhouse conditions, with the objective of reducing the problems associated with the variability of the soil and the spatial distribution of the pathogen, frequently associated to soil pathogens (Larkin *et al.*, 1995; Gumpertz *et al.*, 1997), particularly when a high number of treatments are being handled.

Isolation, identification and pathogenicity tests of the organisms associated with chile wilt. Rhizospheric soil and chile de árbol plants (*Capsicum annuum* L) with wilt symptoms were collected from three locations in VMH. The stems and roots were superficially disinfected according to the description of Silva-Rojas *et al.* (2009) and González-Pérez *et al.* (2004). They were sectioned in 1 cm segments to be cultivated in potato dextrose agar (PDA) and were incubated at room temperature (25°C). The resulting fungal isolates, or oomycetes, were purified in PDA or V8 medium, according to the specific case. The genus identification was done based on Barnett and Hunter (1998) and Erwin and Ribeiro (1996) keys. On a species level, *Fusarium* was identified through Booth's (1977) taxonomic keys and *Rhizoctonia* based on Sneh *et al.* (1991). For *Phytophthora*, the Gallegly and Hong (2008)

al. (2009) y González-Pérez *et al.* (2004), se seccionaron en segmentos de 1 cm para sembrarlos en medio papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron a temperatura ambiente (25 °C). Los aislamientos de hongos u oomicetos resultantes fueron purificados en PDA o medio V8, según el caso. La identificación a nivel de género se realizó con base en las claves de Barnett y Hunter (1998) y Erwin y Ribeiro (1996). A nivel especie, *Fusarium* se identificó mediante las claves taxonómicas de Booth (1977) y *Rhizoctonia* con base en Sneh *et al.* (1991). Para *Phytophthora* se utilizaron las claves de Gallegly y Hong (2008). Las estructuras reproductivas se midieron utilizando una cámara digital (Motic 2300, USA) conectada a una computadora marca Dell.

Las pruebas de patogenicidad se realizaron en cámara de temperatura y luz controlada utilizando semillas de chile de árbol procedentes del estado de Jalisco. Las semillas se germinaron en cajas de Petri con papel filtro y agua destilada estéril. Una vez germinadas se transfirieron a charolas de poliuretano de 200 cavidades, con sustrato estéril a base de turba y agrolita (1:1). Se trasplantaron plántulas con 3 a 4 pares de hojas verdaderas a vasos de poliuretano de 1 L con suelo de la VMH previamente esterilizado. La prueba de patogenicidad se realizó dos veces. En cada prueba se inocularon cuatro plantas por cada género de hongo u oomiceto, con un testigo no inoculado en cada caso.

Para los aislamientos de *Fusarium* se aplicó al cuello del tallo de cada planta 1 ml de una suspensión de conidios (Silva-Rojas *et al.*, 2009) con 1×10^6 esporas/planta. En el caso de *Rhizoctonia* sp. se inoculó una suspensión de micelio (Singh *et al.*, 2002; Pineda *et al.*, 2005) de 1×10^5 unidades formadoras de colonias/planta. En el caso de *Phytophthora* sp se inocularon 1×10^5 zoosporas/planta (Morán-Bañuelos *et al.*, 2010). En cada unidad experimental se evaluó la presencia o ausencia de síntomas. Las evaluaciones se realizaron cada 2 d

keys were used. The reproductive keys were measured using a digital camera (Motic 2300, USA) connected to a Dell computer.

The pathogenicity tests were done in a growth chamber with controlled temperature and light using chile de árbol seeds from the state of Jalisco. The seed were germinated in Petri dishes with filter paper and distilled water. Once the seeds germinated, they were transferred to Polyurethane trays with 200 cavities with sterile substrate made of peat and agrolite (1:1). Seedlings with 3 to 4 pairs of real leaves were transplanted to 1 L polyurethane vessels with previously sterilized soil from VMH. The pathogenicity test was performed twice. In each test, four plants were inoculated for each fungal or oomycetes genus, with a non-inoculated control in each case.

For the *Fusarium* isolates, 1 ml of the conidial suspension was administered to the stem of each plant (Silva-Rojas *et al.*, 2009) with 1×10^6 spores/plant. In the case of *Rhizoctonia* sp., a suspension of mycelium was inoculated (Singh *et al.*, 2002; Pineda *et al.*, 2005) having 1×10^5 colony forming units/plant. In the case of *Phytophthora* sp., 1×10^5 zoospores/plant (Morán-Bañuelos *et al.*, 2010) were inoculated. In each experimental unit the presence or absence of symptoms was evaluated. The evaluations were done every 2 days during 30 days and the causative agent was isolated once again in order to comply with Kock's postulates (Agrios, 2005).

The identification of the isolated organisms was confirmed through the sequencing of fragments of the ITS region, amplified by means of the PCR technique. The extraction of DNA was done according to Sambrook and Russell (2001). For the PCR test, 2.5 µL of reaction buffer were used, 1.25 µL MgCL₂, 0.5 µL dNTP's, 1 µL of primer ITS4, 1 µL of primer ITS5, 0.5µL of Taq DNApol, 2 µL of DNA and 16.25 µL of water for injection

durante 30 d y se aisló nuevamente el agente causal para apearse a los postulados de Koch (Agrios, 2005).

Se confirmó la identidad de los organismos aislados mediante secuenciación de fragmentos de la región ITS, amplificados mediante la técnica de PCR. La extracción de DNA se realizó con base en Sambrook y Russell (2001). Para la prueba de PCR se utilizaron 2.5 µL de amortiguador de reacción, 1.25 µL MgCL₂, 0.5 µL de dNTP's, 1 µL de primer ITS4, 1 µL de primer ITS5, 0.5 µL de Taq DNApol, 2 µL de DNA y 16.25 µL de agua inyectable (White *et al.*, 1990). Los primers se sintetizaron en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT-UNAM). La amplificación se realizó en un termociclador Techne®, modelo TC-512, de acuerdo al procedimiento descrito por Silva-Rojas *et al.* (2009). Para verificar el producto de la amplificación se realizó electroforesis a 90 V por 30 min en gel de agarosa al 1% y tinción con 1 µL de bromuro de etidio. La secuenciación se realizó por la empresa Macrogen, Corea. La secuencia obtenida fue alineada con las depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Evaluación de resistencia de cultivares de chile de árbol a *Phytophthora*. Debido a que solamente *P. capsici* causó síntomas de marchitez y muerte de plantas en las pruebas de patogenicidad, la resistencia a este patógeno se evaluó en diez accesiones de chile de árbol colectadas en los estados de Jalisco, Nayarit y Puebla, cultivadas en suelo natural y en sustrato a base de turba-agrolita (1:1). La semilla fue desinfectada superficialmente mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% (V/V) y dos lavados subsecuentes con agua destilada. Se trasplantaron plántulas de cada accesión con 3 ó 4 pares de hojas verdaderas en macetas de 250 mL con turba-agrolita (1:1) o suelo

(White *et al.*, 1990). The primers were synthesized in the Instituto de Biotecnología of the UNAM (IBT-UNAM). The amplification was done in a Techne® thermal cycler, model TC-512, according to the procedure described by Silva-Rojas *et al.* (2009). In order to verify the product of the amplification, electrophoresis was carried out at 90 V for 30 minutes in the agarose gel at 1 % with 1 µL of ethidium bromide. The sequencing was carried out by the Macrogen Company (Korea). The sequence obtained was aligned with those entered into the database of the National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Resistance evaluation of chile de árbol cultivars to *Phytophthora*. Due to the fact that only *P. capsici* caused wilt and plant death symptoms in the pathogenicity tests, the resistance to this pathogen was evaluated in ten chile de árbol accessions collected from the states of Jalisco, Nayarit and Puebla, cultivated in natural soil and in substrate made of peat-agrolite (1:1). The seed was superficially disinfected through immersion in a solution of sodium hypochlorite at 1.5 % (V/V) and two subsequent rinses with distilled water. Seedlings from each accession with 3 or 4 pairs of real leaves were transplanted to 250 mL pots with peat-agrolite (1:1) or non-sterilized soil from VMH, La Paila locality, and were kept in a greenhouse at the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. The production of the inoculum and inoculation was done through the same procedure described for the pathogenicity tests. The inoculation was done 72 hours after the transplant. Before the inoculation, saturated irrigation was applied in order to create optimal conditions for the infection by *P. capsici*. A re-inoculation was done 15 days after the transplant in order to increase the possibility of infection (Andrés *et al.*, 2005; Morán-Bañuelos *et al.*, 2010).

no esterilizado de la VMH, localidad La Paila, y se mantuvieron en un invernadero del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. La producción de inóculo e inoculación se realizaron mediante el mismo procedimiento descrito para las pruebas de patogenicidad. La inoculación se realizó 72 h después del trasplante. Antes de la inoculación se aplicó un riego a saturación para crear condiciones óptimas para la infección por *P. capsici*. Se realizó una reinoculación a los 15 d después del trasplante, con la finalidad de aumentar la probabilidad de infección (Andrés *et al.*, 2005; Morán-Bañuelos *et al.*, 2010).

Se usó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. La unidad experimental estuvo constituida por dos plantas por repetición. El experimento se realizó dos veces. Se evaluó la severidad de la enfermedad cada tres días con base en la escala de Sanogo (2006) y a partir de estos datos se calculó el área bajo la curva del progreso de la severidad (Campbell y Madden, 1990). Se registró el peso seco de la parte aérea de las plantas después de someterlas a desecación a 70 °C durante 72 h. Se realizó el análisis de varianza mediante el procedimiento ANOVA del programa SAS (Statistical Analysis System) v. 9.3. Cada experimento fue analizado por separado. Las comparaciones entre promedios se realizaron con base en la prueba de Tukey (Steel *et al.*, 1997).

Efectividad de productos químicos disponibles en el mercado mexicano para el control de la marchitez por *P. capsici*. Se utilizaron semillas de chile de árbol procedentes del estado de Jalisco. Se trasplantó una plántula con 5 a 8 pares de hojas verdaderas a macetas de 250 mL con suelo no tratado procedente de las localidades San Pedro Tlatemalco, Tres Cruces o la Paila, VMH, donde se cultiva regularmente chile de árbol. Las macetas se colocaron en un invernadero del Colegio

A completely random design was used with four repetitions of each treatment. The experimental unit was comprised of two plants for repetition. The experiment was performed twice. The severity of the disease was evaluated every three days according to the Sanogo scale (2006), and from this information the area under the severity progress curve was calculated (Campbell and Madden, 1990). The dry weight of the aerial parts of the plants was registered after subjecting them to desiccation at 70 °C during 72 hours. The analysis of variance was performed through the ANOVA procedure of the SAS (Statistical Analysis System) v 9.3 program. Each experiment was analyzed separately. The comparisons among averages were done according to the Tukey test (Steel *et al.*, 1997).

Effectiveness of chemical products available in the Mexican market for the control of wilt caused by *P. capsici*. Chile de árbol seeds from the state of Jalisco were used. A seedling with 5 to 8 pairs of real leaves was transplanted to 250 mL pots with non-treated soil from the localities of San Pedro Tlatemalco, Tres Cruces and la Paila, VMH, where chile de árbol is usually cultivated. The pots were placed in a greenhouse at the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Before the transplant, 1×10^5 encysted zoospores were mixed in the soil of each pot.

The following chemical products were evaluated: metalaxyl at 45.28 % (Ridomild Gold 480 SL, soluble concentrate, Syngenta) $1.5 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$; fosetyl aluminum 80 % (Aliette wdg, dispersible granules, Bayer Crop science) $2.5 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$; propamocarb 64 % (Previcur N, aqueous solution, Bayer Crop Science) $1.5 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$ and metam sodium 42.5 % (Lucafum, aqueous solution, Lucava chemical) $0.1 \text{ L}\cdot\text{L}^{-1}$ for 43 hours and 45 days aeration. Parallel to these treatments, three control were evaluated: 1) plants without fungicides and without inoculation,

de Postgraduados, Campus Montecillo. Antes del trasplante se mezclaron 1×10^5 zoosporas enquistadas en el suelo de cada maceta.

Se evaluaron los siguientes productos químicos: metalaxil al 45.28 % (Ridomild Gold 480 SL, concentrado soluble, Syngenta) $1.5 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$; fosetil aluminio 80 % (Aliette wdg, gránulos dispersables, Bayer Crop science) $2.5 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$; propamocarb 64% (Previcur N, solución acuosa, Bayer Crop Science) $1.5 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$ y metam sodio 42.5 % (Lucafum, solución acuosa, química Lucava) $0.1 \text{ L}\cdot\text{L}^{-1}$, por 43 h y 45 d aireación. A la par de estos tratamientos se evaluaron tres testigos: 1) plantas sin fungicidas y sin inoculación, cultivadas en suelo esterilizado, de cada localidad de la VMH; 2) plantas no inoculadas cultivadas en suelo no esterilizado y 3) plantas inoculada (1×10^5 zoosporas/planta) en suelo esterilizado, de cada localidad. Las combinaciones evaluadas de productos químicos quedaron definidas con base en un arreglo factorial $2 \times 2 \times 2 \times 2$ (con y sin) de los fungicidas metam sodio, metalaxil, fosetil aluminio y propamocarb. De acuerdo con las combinaciones resultantes, se hicieron aplicaciones simples, dobles, triples y cuádruples de fungicida en forma alternada. De esta manera, se evaluó un total de 18 tratamientos, incluyendo los testigos. La primera aplicación de metalaxil, fosetil aluminio o propamocarb se realizó al sustrato en etapa de vivero (1 a 30 d después de la siembra). Subsecuentemente el metalaxil y fosetil aluminio se aplicaron cada 8 d y el propamocarb cada 10 d. Cuando se usó solo un tipo de producto este se aplicó dos veces más. Cuando se alternaron los productos sólo se aplicaron una vez más de acuerdo al orden que les correspondió. Para determinar la cantidad de producto aplicado en cada maceta se calculó la cantidad de agua necesaria para regarlas y se estimó el volumen para una hectárea considerando una densidad de población de 20,000 plantas (Soria 1993). Las plantas se regaron en forma

cultivated in sterilized soil from each VMH location; 2) non-inoculated cultivated plants in non-sterilized soil; and 3) inoculated plants (1×10^5 zoospores/plant) in sterilized soil from each location. The evaluated combinations of chemical products were defined based on a factorial arrangement $2 \times 2 \times 2 \times 2$ (with and without) of the metam sodium, metalaxyl, fosetyl aluminum and propamocarb fungicides. According to the resulting combinations, simple, double, triple and quadruple applications of fungicide were done in an alternated manner. In this manner, a total of 18 treatments, including the control, was evaluated. The first application of metalaxyl, fosetyl aluminum or propamocarb was administered to the substrate in the greenhouse stage (1 to 30 days after cultivation). Subsequently, metalaxyl and fosetyl aluminum were applied every 8 days and propamocarb every 10 days. The products were only administered once more when they were alternated, according to the corresponding order of each. In order to determine the quantity of applied product in each pot, the quantity of necessary water to irrigate them was calculated and the volume for one hectare was estimated considering a population density of 20,000 plants (Soria 1993). The plants were watered in an alternated manner with water and nutritive solution (630 g of Nitrofoska 12-12-12 in 20 L of water: dilution 1:10 (Nitrofoska; water)) (Villar-Luna *et al.*, 2009).

The experiment had an entirely random experimental design, with four repetitions and was performed twice. The same variables of the resistance experiment to *P. capsici* were evaluated and the same statistical analysis approach was applied.

Effectiveness of biological products available in the Mexican market for the control of *P. capsici*.

The genotype used, the handling of the seeds and

alternada con agua y solución nutritiva (630 g de Nitrofoska 12-12-12 en 20 L de agua: dilución 1:10 (Nitrofoska: agua)) (Villar-Luna *et al.*, 2009).

El experimento tuvo un diseño experimental completamente al azar, con cuatro repeticiones y se realizó dos veces. Se evaluaron las mismas variables que en el experimento de resistencia a *P. capsici* y se aplicó el mismo enfoque de análisis estadístico.

Efectividad de productos biológicos disponibles en el mercado mexicano para el control de *P. capsici*. El genotipo utilizado, el manejo de la semilla y plántulas, el procedimiento de inoculación al suelo, testigos, nutrición, método de cálculo de dosis, diseño experimental, variables evaluadas y metodologías de análisis estadístico en esta parte del trabajo fueron los mismos descritos para los experimentos de control químico. Se evaluaron los cuatro únicos productos biológicos disponibles en el mercado nacional: Natucontrol® (*Trichoderma harzianum*) a 400 g·ha⁻¹; Fus out® (*T. harzianum*) a 1 L·ha⁻¹; Baktillis® (*Bacillus subtilis*) a 1 L·ha⁻¹; Probac BS 10® (*B. subtilis*) a 1 L·ha⁻¹. En calidad de tratamientos se incluyó la evaluación individual de los cuatro productos, pero además se comparó la combinación de Natucontrol o Fus out mezclado con Baktillis o con Probac con la finalidad de utilizar una mezcla de organismos con diferente actividad antagonista, estrategias de colonización y mecanismos de supresión que pudiesen causar un efecto sinérgico (Raupach y Kloepper, 1998; Mathre *et al.*, 1999; Akgül y Mirik, 2008). La primera aplicación se realizó 48 h previas al trasplante; la segunda se hizo al momento del trasplante y la tercera 15 d después. Cuarenta y ocho horas después del trasplante se aplicaron 1 x 10⁵ zoosporas de *P. capsici* a cada maceta. Todos los tratamientos fueron aplicados bajo un diseño factorial (8 x 3) en combinación con suelo procedente de las localidades

seedlings, the procedure of soil inoculation, control nutrition, dose calculation methods, experimental design, evaluated variables and statistical analysis methodologies in this part of the work were the same as those described for the chemical control experiments. The only four biological products available in the national market were evaluated: Natucontrol® (*Trichoderma harzianum*) at 400 g·ha⁻¹; Fus out® (*T. harzianum*) at 1 L·ha⁻¹; Baktillis® (*Bacillus subtilis*) at 1 L·ha⁻¹; Probac BS 10® (*B. subtilis*) at 1 L·ha⁻¹. Regarding treatments, the individual evaluation of the four products was included. In addition, the combination of Natucontrol or Fus out mixed with Baktillis or with Probac was compared with the objective of using a mixture of organisms with different activity, colonization strategies, and suppression mechanisms that could cause a synergistic effect (Raupach and Kloepper, 1998; Mathre *et al.*, 1999; Akgül and Mirik, 2008). The first application was done 48 hours prior to the transplant; the second one was done at the moment of the transplant, and the third one 15 days after. 48 hours after the transplant, 1 x 10⁵ zoospores of *P. capsici* were applied to each pot. All treatments were applied under a factorial design (8 x 3) combined with soil from San Pedro Tlatemalco, Tres Cruces and La Paila, of VMH. The experiment was done twice.

RESULTS

Identification and pathogenicity tests. From the roots and stems of the chile de árbol, nine strains from the *Fusarium* genus, three from the *Rhizoctonia* genus and one from the *Phytophthora* genus were isolated. Their correspondence to the *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr., *Rhizoctonia solani* Kühn and *Phytophthora capsici* Leonian species was determined through morphological and

San Pedro Tlatemalco, Tres Cruces y La Paila, de la VMH. El experimento se realizó dos veces.

RESULTADOS

Identificación y pruebas de patogenicidad. De las raíces y tallos de chile de árbol se aislaron nueve cepas del género *Fusarium*, tres de *Rhizoctonia* y una de *Phytophthora*. Mediante el análisis morfológico y molecular se determinó que correspondieron a las especies *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian. Esta última tuvo una homología de 100% con la cepa KJ855326 del GenBank, National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) que corresponde a la misma especie. De estos patógenos únicamente *P. capsici* causó amarillamiento, marchitez, necrosamiento del tallo y muerte de las plantas, a partir de los 7 d después de la inoculación, en los dos bioensayos realizados.

Evaluación de resistencia de cultivares de chile de árbol a *Phytophthora capsici*. De acuerdo al análisis de varianza de los datos de los dos experimentos, el área bajo la curva del progreso de la severidad (ABCPS) en colectas de chile inoculadas con el oomiceto varió con el tipo de cultivar ($P < 0.0001$) y con el sustrato ($P < 0.0001$), pero también ocurrió una interacción altamente significativa entre cultivar y sustrato ($P < 0.0001$). El ABCPS fue más alto cuando las plantas fueron cultivadas en turba-agrolita en comparación con las crecidas en suelo no tratado de la VMH. Las colectas CP 1264 y 1261 tuvieron la menor ABCPS en turba-agrolita, según el experimento, y en suelo tuvieron valores aún más bajos (Figura 1). Los cultivares CP 1305, CP Compuesto Jalisco 1, CP Compuesto Jalisco 2, CP 1306, CP 1261 y CP 1205 tuvieron

molecular analyses. The latter had a homology of 100 % with the KJ855326 strain of the GenBank, National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), which corresponds to the same species. From these pathogens, only *P. capsici* caused yellowing, wilt, and necrosis of the stems and the death of the plant, within 7 days after inoculation, in both bioassays conducted.

Resistance evaluation of chile de árbol cultivars to *Phytophthora capsici*. According to the analysis of variance of the data from both experiments, the area under the severity progress curve (AUSPC) in collections of chile inoculated with the oomycete varied according to the type of cultivar ($P < 0.0001$) and substrate ($P < 0.0001$); there was also a highly significant interaction between the cultivar and the substrate ($P < 0.0001$). The AUSPC was higher when the plants were cultivated in peat-agrolite compared to those cultivated in non-treated soil from VMH. The CP 1264 and 1261 accessions had the smallest AUSPC in peat-agrolite, according to the experiment, and in normal soil they had even smaller values (Figure 1). The CP 1305, CP Compuesto Jalisco 1, CP Compuesto Jalisco 2, CP 1306, CP 1261 and CP 1205 cultivars had average values of around 80 to 100 units in peat-agrolite, but once they were cultivated in soil the AUSPC decreased to values of around 40 units (Figure 1A). In the case of CP Compuesto Nayarit, CP Compuesto Puebla 1 and CP Compuesto Puebla 2 cultivars the AUSPC was consistently higher than the rest of the collections, regardless of the substrate in which the plants were cultivated. The AUSPC values in the non-inoculated plants were zero in all cases, with the exception of CP Compuesto Puebla 2, cultivated in soil, which was the only one that showed symptoms of disease under these conditions but with values that were very close to zero.

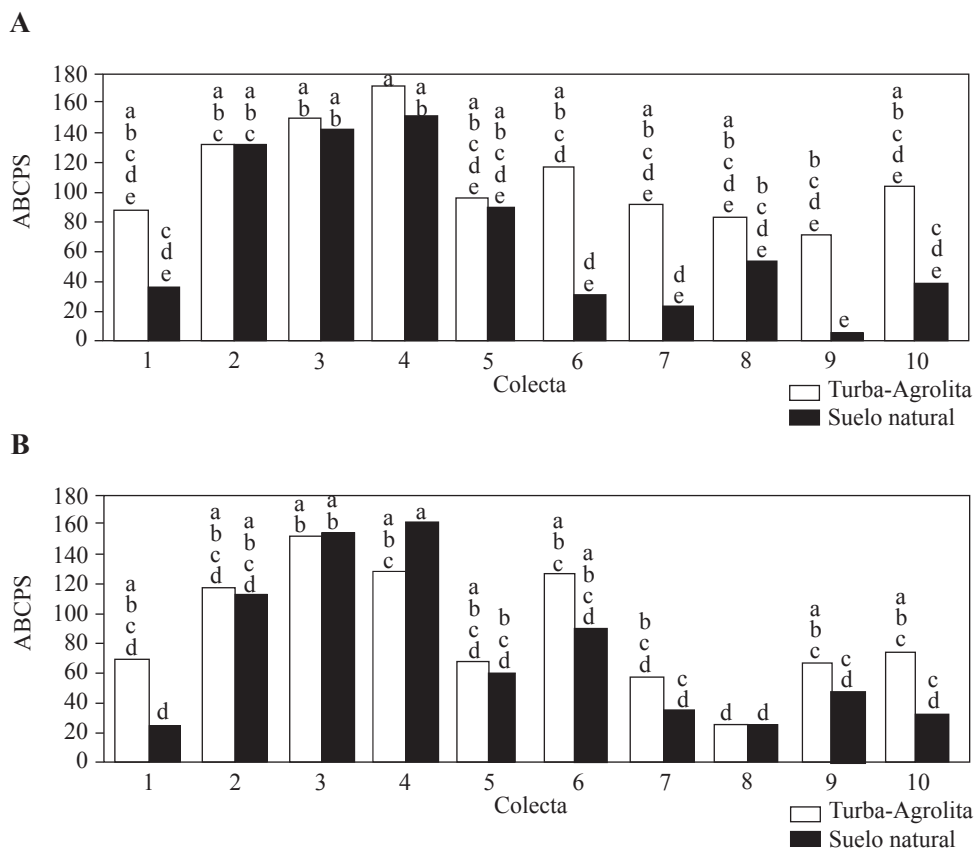


Figura 1. Área bajo la curva del progreso de la severidad de la marchitez de diferentes colectas de chile de árbol (*Capsicum annuum*) inoculadas con una cepa de *Phytophthora capsici* aislada de chile de árbol en suelo de la vega de Metztlán, Hidalgo (VMH). Plantas cultivadas en turba-agrolita estéril, 1:1 y plantas cultivadas en suelo no tratado colectado en la VMH. Experimento 1(A) y 2 (B). Los números en el eje X indican el cultivar: 1) CP 1305, 2) CP Compuesto Nayarit, 3) CP Compuesto Puebla 1, 4) CP Compuesto Puebla 2, 5) CP Compuesto Jalisco 1, 6) CP Compuesto Jalisco 2, 7) CP 1306, 8) CP 1261, 9) CP 1264, 10) CP 1265. Cada valor es el promedio de cuatro repeticiones. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha = 0.05$).

Figure 1. Area under the curve of the severity progress of wilt of different accessions of chile de árbol (*Capsicum annuum*) inoculated with a strain of *Phytophthora capsici* isolated from chile de árbol in soil from Vega de Metztlán, Hidalgo (VMH). Plants cultivated in sterile peat-agrolite, 1:1 and plants cultivated in non-treated soil collected in VMH. Experiment 1(A) and 2 (B). The numbers in axis X indicate the cultivar: 1) CP 1305, 2) CP Compuesto Nayarit, 3) CP Compuesto Puebla 1, 4) CP Compuesto Puebla 2, 5) CP Compuesto Jalisco 1, 6) CP Compuesto Jalisco 2, 7) CP 1306, 8) CP 1261, 9) CP 1264, 10) CP 1265. Each value is the average of four repetitions. Means with the same letter are statistically equal (Tukey $\alpha = 0.05$).

valores promedio alrededor de las 80 a 100 unidades en turba-agrolita, pero al ser cultivadas en suelo el ABCPS se redujo a valores alrededor de 40 unidades (Figura 1A). En el caso de los cultivares CP Compuesto Nayarit, CP Compuesto Puebla 1 y CP Compuesto Puebla 2 el ABCPS fue consistentemente

In experiment 1, the analysis of variance indicates that the dry weight of the plants varied only in relation to the type of substrate ($P < 0.0001$) and the genotype ($P = 0.034$), but there was no interaction effect between both factors ($P = 0.48$). The non-inoculated plants in VMH soil, produced

más alto que en el resto de colectas, independientemente del sustrato en que fueron cultivadas las plantas. Los valores de ABCPS en las plantas no inoculadas fueron de cero en todos los casos, con excepción del CP Compuesto Puebla 2 cultivado en suelo, quien fue el único que mostró síntomas de enfermedad bajo estas condiciones pero tuvo valores muy cercanos a cero.

En el experimento 1, el análisis de varianza indica que el peso seco de las plantas varió sólo en función del tipo de sustrato ($P < 0.0001$) y del genotipo ($P = 0.034$), pero no hubo efecto de interacción entre ambos factores ($P = 0.48$). Las plantas no inoculadas en suelo de la VMH produjeron en promedio 0.44 g/planta, mientras que las cultivadas sin inoculación en turba-agrolita produjeron 0.2 g/planta. En el caso de las plantas inoculadas los valores fueron 0.12 y 0.09 g/planta, respectivamente y resultaron estadísticamente diferentes (Tukey $\alpha = 0.05$) con respecto a las no inoculadas. En el caso de los cultivares los valores variaron de 0.33 g/planta, en el cultivar CP 1306, a 0.15 g/planta, en el cultivar Compuesto Puebla 1. Solo las diferencias entre estos dos cultivares resultaron significativas (Tukey $\alpha = 0.05$). El resto de genotipos tuvo valores intermedios y estadísticamente iguales a ambos promedios.

En el experimento 2, se observó un patrón similar en la acumulación de materia seca en la parte aérea en la mayoría de los casos, con excepción de las colectas CP 1305, CP 1261 y Compuesto Jalisco 1 que mostraron los valores más altos de su grupo de inoculación (Figura 2).

Efectividad de productos químicos disponibles en el mercado mexicano para el control de la marchitez por *P. capsici*. Los resultados del análisis de varianza del ABCPS indican que en las plantas cultivadas en los tres suelos de la VMH (San Pedro Tlatemalco, La Paila y Tres Cruces) ocurrió

an average of 0.44 g/plant, while those cultivated without inoculation in peat-agrolite produced 0.2 g/plant. In the case of the inoculated plants the values were 0.12 and 0.09 g/plant, respectively and were statistically different (Tukey $\alpha = 0.05$) compared to the non-inoculated plants. In the case of the cultivars the values varied from 0.33 g/plant, in the CP 1306 cultivar, to 0.15 g/plant in the Compuesto Puebla 1 cultivar. The differences between these two cultivars were the only significant ones (Tukey $\alpha = 0.05$). The remaining genotypes had intermediate and statistically equal values to both averages.

In experiment 2, a similar pattern in the accumulation of dry matter in the aerial part was observed in the majority of the cases, with the exception of collections: CP 1305, CP 1261 and Compuesto Jalisco 1 that showed the highest values of their inoculation groups (Figure 2).

Effectiveness of chemical products available in the Mexican market for the control of wilt caused by *P. capsici*. The results of the analysis of variance of the AUSPC indicate that the plants cultivated in the three soils from VMH (San Pedro Tlatemalco, La Paila and Tres Cruces) there was a significant interaction between the four chemical products evaluated ($P < 0.0001$). The inoculated plants that were not treated with chemical products had considerably higher AUSPC values than the rest of the treatments, while the plants cultivated in non-inoculated soil did not show disease symptoms, regardless of the sterilization or lack thereof of the soil. Metalaxyl, fosetyl-aluminum or propamocarb, applied alone, and the alternation of metalaxyl with fosetyl-aluminum or with propamocarb, presented a total disease control in both experiments carried out (Figure 3). The remaining treatments showed variations in the level of disease control, with total control cases as well as low levels of AUSPC, that varied between 0 and 125 units (Figure 3). The

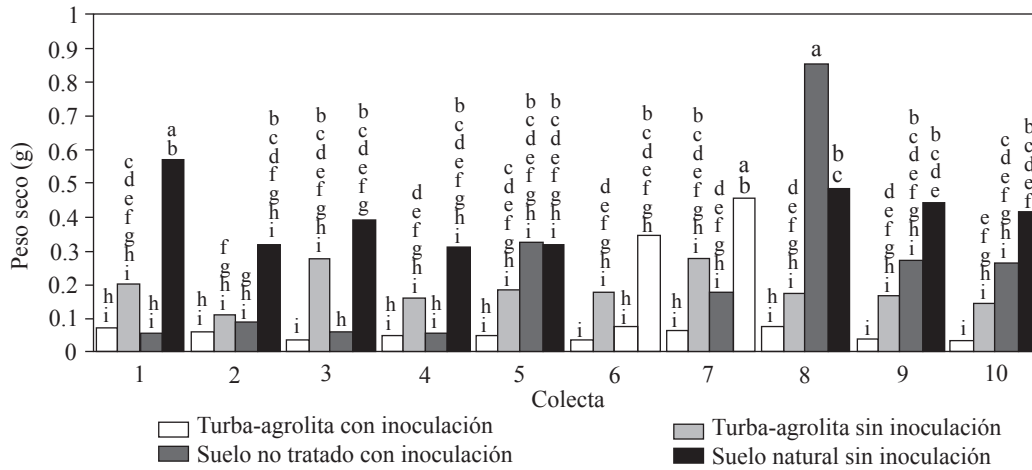


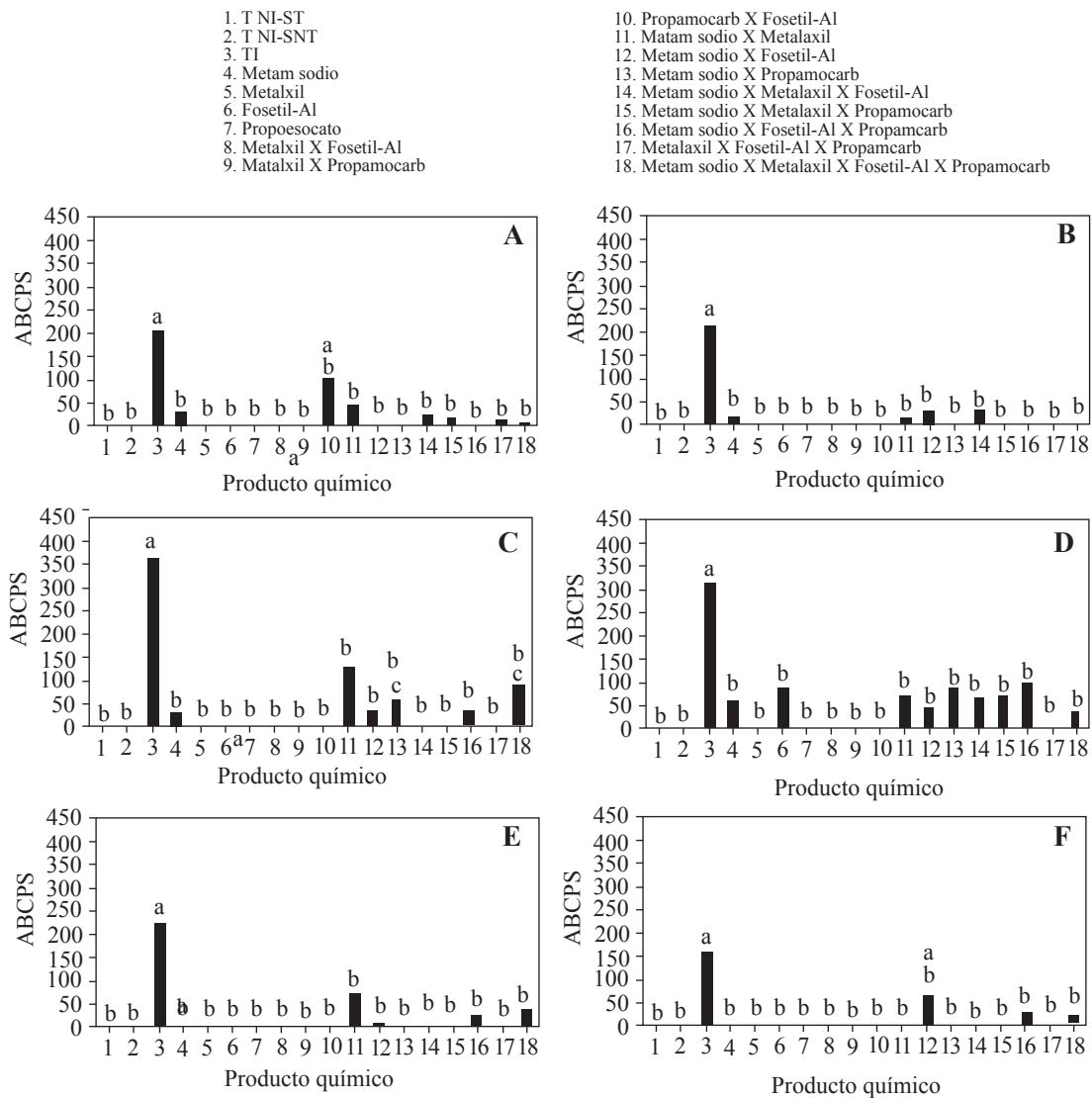
Figura 2. Experimento 2. Peso seco de la parte aérea de diferentes colectas de chile de árbol (*Capsicum annuum*) cultivadas en turba-agrolita, 1:1 y en suelo de la Vega Metztlán, Hidalgo (VMH), con y sin inoculación con *Phytophthora capsici*, aislada de plantas de chile de árbol de la VMH. Los números en el eje X indican las colectas: 1) CP 1305, 2) CP Compuesto Nayarit, 3) CP Compuesto Puebla 1, 4) CP Compuesto Puebla 2, 5) CP Compuesto Jalisco 1, 6) CP Compuesto Jalisco 2, 7) CP 1306, 8) CP 1261, 9) CP 1264, 10) CP 1265. Promedios de cuatro repeticiones. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha = 0.05$).

Figure 2. Experiment 2. Dry weight of the aerial part of different accessions of chile de árbol (*Capsicum annuum*) cultivated in peat-agrolite, 1:1 and in soil from Vega Metztlán, Hidalgo (VMH), with and without inoculation with *Phytophthora capsici*, isolated from chile de árbol plants from VMH. The numbers in axis X indicate the collections: 1) CP 1305, 2) CP Compuesto Nayarit, 3) CP Compuesto Puebla 1, 4) CP Compuesto Puebla 2, 5) CP Compuesto Jalisco 1, 6) CP Compuesto Jalisco 2, 7) CP 1306, 8) CP 1261, 9) CP 1264, 10) CP 1265. Average of four repetitions. Means with the same letter are statistically equal (Tukey $\alpha = 0.05$).

una interacción significativa entre los cuatro productos químicos evaluados ($P < 0.001$). Las plantas inoculadas sin aplicaciones de productos químicos tuvieron valores de ABCPS considerablemente más altos que el resto de tratamientos, mientras que las plantas cultivadas en suelo no inoculado no mostraron síntomas de la enfermedad, independientemente de si el suelo fue esterilizado o no. El metalaxil, fosetil aluminio o propamocarb, aplicados solos, y la alternancia de metalaxil con fosetil aluminio o con propamocarb, tuvieron un control total de la enfermedad en los dos experimentos realizados en suelo de cada localidad (Figura 3). El resto de tratamientos mostraron variaciones en el nivel de control de la enfermedad, con casos tanto de control total como niveles bajos en el ABCPS, que variaron entre cero y 125 unidades (Figura 3).

alternated applications with three or four products did not present a total control of the disease in all cases, but the maximum areas calculated did not exceed 90 units.

When comparing the effect of the soil on the AUSPC, it can be observed in Figure 3 that in the soil from Tres Cruces there were more symptoms of the disease than in the soils from San Pedro Tlatemalco and La Paila, as well as a decreased consistency in the reproducibility of the results among experiments; however, even in this scenario, the recurring treatments of metalaxyl or propamocarb, or the alternated application of metalaxyl with fosetyl aluminum or with propamocarb and propamocarb with fosetyl aluminum, presented a total control of the disease in both experiments.



Las aplicaciones alternadas con tres o cuatro productos no tuvieron un control completo de la enfermedad en todos los casos, pero las áreas máximas calculadas no excedieron las 90 unidades.

Al comparar el efecto de suelo sobre el ABCPS puede observarse en la Figura 3 que en el suelo de Tres Cruces hubo más casos de síntomas de enfermedad que en los suelos de San Pedro Tlatemalco y La Paila, así como menor consistencia en la reproducibilidad de los resultados entre experimentos; sin embargo, aún en este escenario los tratamientos recurrentes de metalaxil o propamocarb, o la aplicación alternada de metalaxil con fosetil aluminio o con propamocarb y propamocarb con fosetil aluminio, tuvieron un control total de la enfermedad en ambos experimentos.

De acuerdo al análisis de varianza, en el experimento 1 con suelo de San Pedro Tlatemalco, sólo las aplicaciones de metam sodio alternado con metalaxil tuvieron efecto significativo ($P=0.037$) sobre el peso seco de la parte aérea (PSPA). En este experimento, cuando se aplicó metalaxil solo, el PSPA resultó ligeramente mayor (1.24 g/planta) que en las plantas no tratadas (1.05 g/planta); cuando se aplicó metam sodio solo o alternado con metalaxil el PSPA fue considerablemente menor (0.36 y 0.23 g/planta) que en los dos tratamientos anteriores. En el experimento 2, sólo las interacciones metam sodio X fosetil aluminio ($P=0.01$) y metalaxil X fosetil aluminio X propamocarb ($P=0.05$) resultaron significativas. Con la aplicación del fosetil aluminio solo, se obtuvo un PSPA mayor que el testigo inoculado y sin tratamiento químico (1.56 vs 0.98 g/planta); cuando se aplicó metam sodio solo o combinado con fosetil aluminio el PSPA se redujo a 0.26 y 0.32 g/planta respectivamente. Por otra parte, cuando se aplicó metalaxil alternado con fosetil aluminio y propamocarb se obtuvo casi el triple de PSPA (1.28 g/planta) que en el testigo inoculado (0.45 g/planta). Las aplicaciones de cualquiera

According to the analysis of variance, in experiment 1 with soil from San Pedro Tlatemalco, only the applications of metam sodium alternated with metalaxyl had a significant effect ($P=0.037$) over the dry weight of the aerial part (DWAP). In this experiment, when the metalaxyl was applied alone, the DWAP was slightly higher (1.24 g/plant) than in the non-treated plants (1.05 g/plant); when metam sodium was applied alone or alternated with metalaxyl the DWAP was considerably lower (0.36 and 0.23 g/plant) than in the two previous treatments. In experiment 2, only the metam sodium interactions X fosetyl aluminum ($P=0.01$) and metalaxyl X fosetyl aluminum X propamocarb ($P=0.05$) were significant. With the application of fosetyl-aluminum, a higher DWAP than that of the inoculated control and without chemical treatment (1.56 vs 0.98 g/plant) was obtained; when metam sodium alone or combined with fosetyl aluminum was applied, the DWAP was reduced to 0.26 and 0.32 g/plant, respectively. Conversely, when metalaxyl alternated with fosetyl-aluminum and propamocarb was applied, almost three times the value of DWAP (1.28 g/plant) compared to that of the inoculated control (0.45 g/plant) was obtained. The administration of any of the three products in an individual manner or in simple alternation, even though it incremented the DWAP in comparison to the control, produced inferior values to the treatment with the three alternated fungicides, but which were considerably higher than the inoculated control (0.64 to 1 g/plant). In Tres Cruces soil, the analysis of variance of the DWAP in experiment 1 reported significant interaction among the four chemical products ($P=0.012$), while in experiment 2 only the metam sodium X metalaxyl interaction was significant ($P=0.004$). In experiment 1, the DWAP of the cultivated plants in non-sterilized and non-inoculated plants (1.12 g/plant) was significantly lower than that of the non-inoculated plants that

de los tres productos en forma individual o en alternación simple, aunque incrementó el PSPA con respecto al testigo produjo valores inferiores al tratamiento con los tres fungicidas alternados pero considerablemente más altos que el testigo inoculado (0.64 a 1 g/planta).

En el suelo de Tres Cruces el análisis de varianza del PSPA en el experimento 1 reportó interacción significativa entre los cuatro productos químicos ($P=0.012$), mientras que en el experimento 2 sólo la interacción metam sodio X metalaxil fue significativa ($P = 0.004$). En el experimento 1, el PSPA de las plantas cultivadas en suelo no esterilizado y no inoculado (1.12 g/planta) fue significativamente menor que el de las no inoculadas y cultivadas en suelo esterilizado (1.93 g/planta) y su promedio y rangos de variación fueron similares a los observados con los tratamientos recurrentes de metalaxil, fosetil aluminio o propamocarb solos, o metalaxil alternado con fosetil aluminio o con propamocarb, o propamocarb alternado con fosetil aluminio (1.25, 1.63, 1.01, 0.9, 0.92 y 1.04 g/planta, respectivamente) ya que sus rangos de variación se traslaparon (datos no mostrados). Las plantas cultivadas en suelo no esterilizado pero sí inoculado con el pseudohongo tuvieron un PSPA considerablemente más bajo (0.26 g/planta) que en los testigos no inoculados y que los no esterilizados, inoculados y tratados con los químicos antes mencionados. Cuando se fumigó con metam sodio únicamente o cuando se alternó este producto con los demás químicos el PSPA fue aún más bajo (0.039 a 0.25 g/planta) que el observado en el testigo inoculado y sin tratamiento químico. En el tratamiento alternado con metalaxil, fosetil aluminio y propamocarb, se produjo más del doble de PSPA (0.73 g/planta) que en el testigo inoculado y que en los tratamientos donde estuvo involucrado el metam sodio. Similarmente, en el experimento 2, cuando se aplicó metam sodio solo ocurrió tam-

were cultivated in sterilized soil (1.93 g/plant) and their average and range of variation were similar to those observed with the recurring treatments of metalaxyl, fosetyl aluminum or propamocarb alone, or metalaxyl alternated with fosetyl aluminum or with propamocarb, or propamocarb alternated with fosetyl aluminum (1.25, 1.63, 1.01, 0.9, 0.92 and 1.04 g/plant, respectively) because their variation ranges overlapped (data not shown). The cultivated plants in non-sterilized but inoculated soil with the oomycete had a considerably lower DWAP (0.26 g/plant) than that in the non-inoculated and non-sterilized, inoculated control that were treated with the aforementioned chemicals. When fumigating with metam sodium alone or when alternating this product with the remaining chemicals, the DWAP was even lower (0.039 to 0.25 g/plant) than the one observed in the control without any chemical treatment. In the alternated treatment with metalaxyl, fosetyl- aluminum and propamocarb, twice the DWAP was produced (0.73 g/plant) than in the inoculated control and in the treatments where metam sodium was involved. Similarly, in experiment 2, when metam sodium was applied there was only one significant decrease in the DWAP (0.24 g/plant) compared to the inoculated control (0.72 g/plant); when applying metalaxyl alone, the average of this variable numerically exceeded that of the inoculated control (1.05 g/plant) and when both products were applied to the same plants the DWAP was 0.17 g/plant but was statistically equal to that observed for metam sodium alone.

In La Paila soil, VMH, no significant treatment effects were detected on the DWAP in the plants of experiment 1, but in experiment 2 a main significant effect of the recurring application of metalaxyl alone ($P= 0.0025$) was detected, or of the interaction metalaxyl X fosetyl aluminum ($P= 0.0011$). In this case, the plants treated with metalaxyl alone had a lower DWAP (0.5 g/plant)

bién una reducción significativa en el PSPA (0.24 g/planta) con respecto al testigo inoculado (0.72 g/planta); al aplicar el metalaxil solo, el promedio de esta variable superó numéricamente al testigo inoculado (1.05 g/planta) y cuando ambos productos se aplicaron a las mismas plantas el PSPA fue de 0.17 g/planta pero resultó estadísticamente igual al observado para el metam sodio solo.

En suelo de La Paila, VMH, no se detectaron efectos significativos de tratamientos sobre el PSPA en las plantas del experimento 1, pero en el experimento 2 se detectó efecto principal significativo de la aplicación recurrente de metalaxil solo ($P=0.0025$), o de la interacción metalaxil X fosetil aluminio ($P=0.0011$). En esta caso las plantas tratadas con metalaxil solo tuvieron menor PSPA (0.5 g/planta) que el testigo inoculado (1.45 g/planta) o que los tratamientos con fosetil aluminio solo (1 g/planta) o combinado con metalaxil (1.05 g/planta), pero los rangos de variación de los cuatro promedios tuvieron traslapes considerables (datos no mostrados).

Efectividad de productos biológicos disponibles en el mercado mexicano para el control de *P. capsici*. Los resultados del análisis de varianza de los dos experimentos indican que sólo los productos biológicos evaluados tuvieron diferencias significativas en el ABCPS ($P<0.0001$). La procedencia del suelo no tuvo significancia por sí sola o en interacción con los biológicos. En ambos experimentos las plantas inoculadas y sin aplicaciones de productos biológicos tuvieron valores de ABCPS más altos que el resto de los tratamientos y las plantas cultivadas en suelo no inoculado tuvieron un valor de cero (Figura 4 A y B). Con excepción del tratamiento Natu Control con Probac, en el experimento 2, la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) indica diferencias significativas entre los tratamientos biológicos y el testigo inoculado y sin medidas de control. Todas las plantas tratadas con algún producto biológico

than the inoculated control (1.45 g/plant) or than that of the fosetyl aluminum alone treatments (1g/plant) or combined with metalaxyl (1.05/plant), but the variation ranges of the four averages had considerable overlaps (data not shown).

Effectiveness of biological products available in the Mexican market for the control of *P. capsici*.

The results of the analysis of variance of the two experiments indicate that only the evaluated biological products had significant differences in the AUSPC ($P<0.0001$). The origin of the soil had no significance by itself or when interacting with the biological products. In both experiments the inoculated plants without any biological product application had higher AUSPC values than the rest of the treatments and the cultivated plants in non-inoculated soil had a value of zero (Figure 4 A and B). With the exception of Natu Control with Probac treatment, in experiment 2, the Tukey test ($\alpha=0.05$) indicates significant differences between the biological treatments and the inoculated control without any control measures. All plants treated with some biological product showed an average low AUSPC value, without statistical differences among them as well as in regard to the non-inoculated control. The lowest AUSPC value was observed in the combination of Fus out with Probac (22.5 units) in experiment 1 and Baktillis (12.9 units) in experiment 2. The rest of the treatments showed variations in the disease level but they did not exceed 80 units in either of the experiments, while the inoculated control reached around 200.

The results of the DWAP analysis of variance in experiments 1 and 2 indicated only significant differences in the effect of biological products ($P=0.0005$ and $P<0.0001$, respectively). In experiment 1, the plants cultivated in non-inoculated soil had the highest DWAP, while the plants inoculated with *P. capsici*, without control measure, had the lowest value (Figure 5 A). Among the biological products,

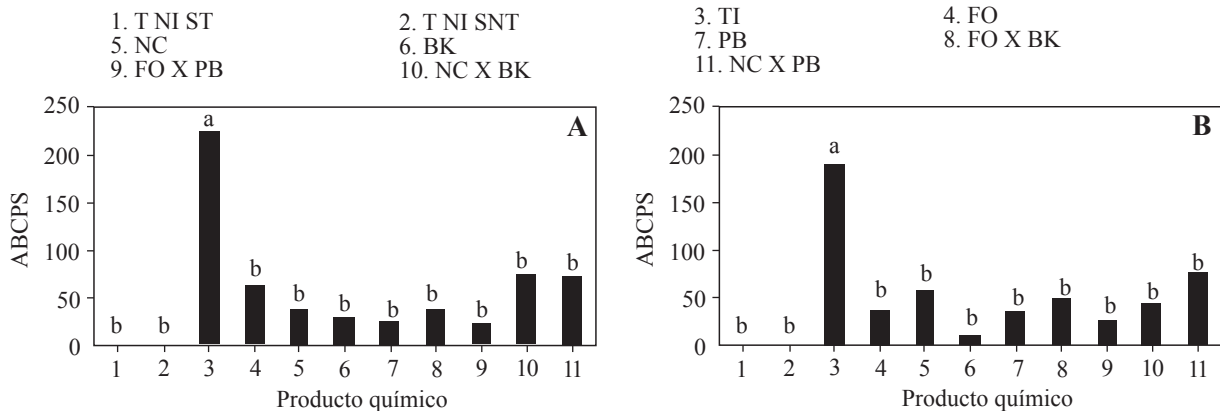


Figura 4. Área bajo la curva del progreso de la severidad de la marchitez de plantas de chile de árbol (*Capsicum annum* L.) cultivadas en suelos con y sin inoculación con *Phytophthora capsici* y tratados con FO=Fus out® (*Trichoderma harzianum*), NC=Natucontrol® (*Trichoderma harzianum*), BK=Baktillis® (*Bacillus subtilis*) o PB=Probac® (*Bacillus subtilis*) solos o combinados. Experimento 1 (A) y 2 (B). T NI-ST: Testigo no inoculado-suelo esterilizado; T NI-SNT: Testigo no inoculado-suelo no esterilizado; TI: Testigo inoculado, suelo esterilizado. La cepa de *P. capsici* fue aislada de chile de árbol de la VMH. La inoculación se realizó con 10^5 zoosporas por planta. Promedios de 12 repeticiones. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).

Figure 4. Area under the curve of severity progress of the wilt of chile de árbol (*Capsicum annum* L.) of plants cultivated in soils with and without inoculation with *Phytophthora capsici* and treated with FO= Fus out® (*Trichoderma harzianum*), NC= Natucontrol® (*Trichoderma harzianum*), BK=Baktillis® (*Bacillus subtilis*) or PB=Probac® (*Bacillus subtilis*) alone or combined. Experiment 1 (A) and 2 (B). NICS-SS: Non-inoculated control sterilized soil; T NI-SNT: Non-inoculated control solution- non-sterilized soil; TI: Inoculated control solution, sterilized soil. The strain of *P. capsici* was isolated from chile de árbol plants from VMH. The inoculation was done with 10^5 zoospores per plant. Means with the same letter are statistically equal (Tukey $\alpha=0.05$).

mostraron en promedio un valor bajo en el ABCPS, sin diferencias estadísticas tanto entre ellas como con respecto a los testigos no inoculados. El valor más bajo de ABCPS se observó con la combinación de Fus out con Probac (22.5 unidades) en el experimento 1 y Baktillis (12.9 unidades) en el experimento 2. El resto de los tratamientos mostraron variaciones en el nivel de la enfermedad pero no excedieron las 80 unidades en ambos experimentos, mientras que el testigo inoculado alcanzó alrededor de 200.

Los resultados del análisis de varianza del PSPA en los experimentos 1 y 2 indicaron únicamente diferencias significativas en el efecto de los productos biológicos ($P=0.0005$ y $P<0.0001$, respectivamente). En el experimento 1, las plantas cultivadas en suelo sin inoculación tuvieron el mayor

the treatments with Fus out plus Baktillis and Natu Control plus Baktillis had statistically equal weights as the ones observed in the non-inoculated control in sterilized soil, but their differences were not significant with regard to the rest of the treatments. The non-inoculated control in non-sterilized soil had the same behavior. The rest of the treatments with any biological product had dry weights that were statistically equal between them and with regard to the inoculated control solution.

In experiment 2, the non-inoculated plants, cultivated in sterilized or non-sterilized soil, had the highest DWAP, while the ones inoculated with *P. capsici*, without any control measures, had the lowest value (Figure 5 B). All plants treated with any biological product, with the exception of the combination of Natucontrol plus Probac, even

PSPA, mientras que las plantas inoculadas con *P. capsici*, sin medidas de control, tuvieron el menor valor (Figura 5 A). Entre los productos biológicos, los tratamientos con Fus out más Baktillis y Natu Control más Baktillis tuvieron pesos estadísticamente iguales que los observados en el testigo no inoculado en suelo esterilizado, pero sus diferencias no resultaron significativas con respecto al resto de tratamientos. El testigo no inoculado en suelo no esterilizado tuvo el mismo comportamiento. El resto de tratamientos con algún producto biológico tuvo pesos secos estadísticamente iguales entre sí y con respecto al testigo inoculado.

En el experimento 2 las plantas no inoculadas, cultivadas en suelo esterilizado o no esterilizado, tuvieron el mayor PSPA, mientras que las inoculadas con *P. capsici*, sin medidas de control, tuvieron

though they had a lower DWAP, were statistically equal to the non-inoculated control (Tukey $\alpha = 0.05$). Conversely, the Fus out, Baktillis and the combination of both treatments had significantly higher averages than those of the inoculated control without control measures. Even though the treatments without biological products showed the aforementioned variations, the differences between their averages were not significant.

DISCUSSION

This document is the first report about the etiology of the chile de árbol wilt in VMH and the effect of different control measures in the soils of the region. The results obtained in this

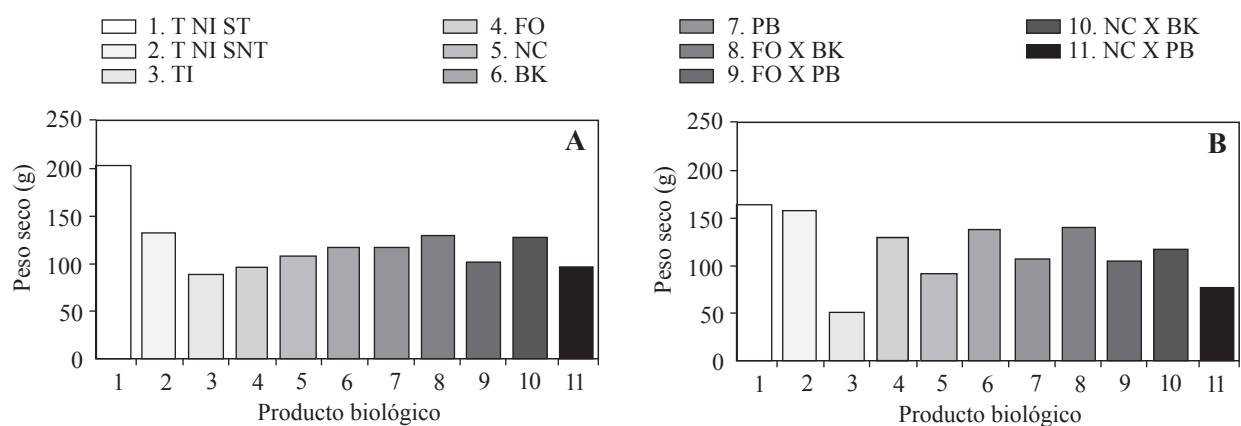


Figura 5. Efecto de productos biológicos sobre el peso seco de la parte aérea de plantas de chile de árbol (*Capsicum annuum* L.) cultivadas en suelos con y sin inoculación con *Phytophthora capsici* y tratadas con FO=Fus out® (*Trichoderma harzianum*), NC=Natucontrol® (*Trichoderma harzianum*), BK=Baktillis® (*Bacillus subtilis*) o PB=Probac® (*Bacillus subtilis*) solos o combinados en el experimento 1 (A) y 2 (B). T NI-ST: Testigo no inoculado-suelo esterilizado; T NI-SNT: Testigo no inoculado-suelo no esterilizado; TI: Testigo inoculado. La cepa de *P. capsici* fue aislada de chile de árbol de la VMH. La inoculación se realizó con 10^5 zoosporas por planta. Promedios de 12 repeticiones. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $p=0.05$).

Figure 5. Effect of the biological products on the dry weight of the aerial part of the chile de árbol plant (*Capsicum annuum* L.) cultivated in soils with and without inoculation with *Phytophthora capsici* and treated with FO= Fus out® (*Trichoderma harzianum*), NC= Natucontrol® (*Trichoderma harzianum*), BK=Baktillis® (*Bacillus subtilis*) or PB=Probac® (*Bacillus subtilis*) alone or combined in experiment 1 (A) and 2 (B). T NI-ST: Non-inoculated control- sterilized soil; T NI-SNT: Non-inoculated control- non-sterilized soil; TI: Inoculated control. The strain of *P. capsici* was isolated from chile de árbol plants from VMH. The inoculation was done with 10^5 zoospores per plant. Means with the same letter are statistically equal (Tukey $\alpha = 0.05$).

el menor valor (Figura 5 B). Todas las plantas tratadas con algún producto biológico, con excepción de la combinación Natucontrol más Probac, aunque tuvieron un PSPA menor, fueron estadísticamente iguales que los testigos no inoculados (Tukey $\alpha=0.05$). Por otra parte los tratamientos Fus out, Baktillis y la combinación de ambos, tuvieron promedios significativamente más altos que el testigo inoculado y sin medidas de control. Aunque los tratamientos con productos biológicos mostraron las variaciones antes mencionadas, las diferencias entre sus promedios no resultaron significativas.

DISCUSION

El presente es el primer reporte sobre la etiología de la marchitez del chile de árbol en la VMH y el efecto de diferentes medidas de control en suelos de la región. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que *P. capsici* es el agente causal de la marchitez del chile en la VMH. Las pruebas de patogenicidad y la identificación morfológica y molecular confirmaron la identidad de este oomiceto. La marchitez causada por *P. capsici* puede ser manejada mediante la integración de varios métodos de control (Granke *et al.*, 2012). Como parte de ésta, las colectas CP 1264, CP 1261 y CP 1305, que mostraron la mayor resistencia a la enfermedad, pueden ser considerados buenos candidatos para ser incluidos en programas de mejoramiento genético o en la integración de un sistema de producción con medidas de control complementarias, como las evaluadas en la presente investigación.

Los resultados de este trabajo muestran que el efecto de cada producto químico, aplicado solo o alternado varió entre suelos de la VMH, pero la enfermedad fue restringida a niveles mínimos e inclusive se logró control total de la marchitez con las aplicaciones individuales y recurrentes de metalaxil,

work show that *P. capsici* is the causative agent of chile wilt in VMH. The pathogenicity tests and the morphological and molecular identification confirmed the identity of this oomycete. The wilt caused by *P. capsici* may be handled through the integration of several control methods (Granke *et al.*, 2012). As a part of this, the CP 1264, CP 1261 and CP 1305 collections that showed the most resistance to the disease, can be considered good candidates to be included in genetic improvement programs or in the integration of a production system with complementary control measures, such as the ones evaluated in this research.

The results of this work show the effect of each chemical product, applied alone or alternated to VMH soils, but the disease was restricted to minimum levels and even total wilt control was also achieved with the individual and recurring applications of metalaxyl, fosetyl aluminum or propamocarb and the alternation of metalaxyl with fosetyl aluminum and metalaxyl with propamocarb. It has been reported that metalaxyl decreases the disease 83.3% (Fernández-Herrera *et al.*, 2007), but in this research a reduction of 100% was obtained. Fosetyl aluminum controlled the disease 66.7% in one of our experiments, but in the rest of them it achieved a total control; meanwhile, propamocarb reduced the disease 100% in all cases. An 83.3% control of the disease with fosetyl aluminum has been reported in tomato plants (Fernández-Herrera *et al.*, 2007) and of 60 to 100% with propamocarb in other cultivars (Hu *et al.*, 2007). Factors such as the quantity of soil used in our experiments, variations in the genotypes of the pathogen and plant involved, and levels of inoculation, could explain the differences with respect to the aforementioned works. Conversely, the accumulation of dry matter in the aerial part, a preliminary indicator of the production potential of fruits by the plants (González-Real, 2008;

fosetil aluminio o propamocarb y la alternancia de metalaxil con fosetil aluminio y metalaxil con propamocarb. Se ha reportado que el metalaxil disminuye la enfermedad en 83.3 % (Fernández-Herrera *et al.*, 2007), pero en la presente investigación se obtuvo una reducción del 100 %. El fosetil aluminio controló la enfermedad en 66.7 % en uno de nuestros experimentos, pero en el resto tuvo un control total, mientras que el propamocarb redujo la enfermedad en 100% en todos los casos. En jitomate se ha reportado un control de la enfermedad de 83.3 % con fosetil aluminio (Fernández-Herrera *et al.*, 2007) y de 60 a 100 % con propamocarb en otros cultivos (Hu *et al.*, 2007). Factores como la cantidad de suelo utilizada en nuestros experimentos, variaciones en los genotipos de patógeno y planta involucrados, y niveles de inóculo, podrían explicar las diferencias con respecto a los trabajos antes mencionados. Por otra parte, la acumulación de materia seca en la parte aérea, un indicador preliminar del potencial de producción de frutos por las plantas (González-Real, 2008; García-Rodríguez, 2010), tendió a ser mayor en las plantas inoculadas y tratadas con estos productos que en los testigos. Tales resultados podrían ser considerados una primera evidencia de que aún existen bajos o nulos niveles de resistencia a los productos químicos disponibles en el mercado mexicano para el control de *P. capsici* en chile de árbol en la VMH, ya que la aplicación recurrente funcionó mejor que la aplicación alternada, dentro del mismo ciclo; también son un indicador de la posibilidad de incrementar o preservar el potencial de producción del cultivo en la región si son utilizados adecuadamente.

A diferencia de los productos antes mencionados, bajo nuestras condiciones experimentales el metam sodio, aunque evitó la ocurrencia de enfermedad en la mayoría de los casos, causó un efecto negativo en la acumulación de materia seca en la parte aérea. Este efecto pudo ser causado por el

García-Rodríguez, 2010), tended to be higher in the inoculated plants that were treated with these products than in the control witness. Such results could be considered first evidence that there are still low or null levels of resistance to the chemical products available in the Mexican market for the control of *P. capsici* in chile de árbol in VHM, because the recurring application worked better than the alternated application, within the same cycle. They are also an indicator to the possibility to increase or preserve the production potential of the cultivation in the region if used correctly.

Unlike the aforementioned products, under our experimental conditions, metam sodium, even though it prevented the disease in the majority of the cases, caused a negative effect in the accumulation of dry matter in the aerial part. This effect could have been caused by the impact of the agrochemical in the soil biota (Cao, 2004) and by phytotoxicity, because some plants transplanted in treated soil showed slight chlorosis, terminal necrosis in the leaves and in some cases necrosis in the stem that wasn't associated with the infection caused by *P. capsici*. Improvements in the management of the product, such as preliminary watering or a longer period of aeration could improve its effectiveness.

The four commercial biological products evaluated did not present total control of the wilt, however, there were important effects in the decrease of the disease with the treatments of Fus out, Natucontrol, Baktillis and Probac alone or combined. The treatments with Baktillis or Fus out with Probac stand out as the ones with low AUSPC values and increased the accumulation of dry matter compared to the inoculated control. The difficulty of introduced microorganisms to be established in the rhizosphere of the crops, is generally associated with high competitiveness and prior adaptation of the native microflora (Van Veen *et al.*, 1997; Agrios, 2005), which could have been

impacto del agroquímico en la biota del suelo (Cao, 2004) y por fitotoxicidad, ya que algunas plantas trasplantadas en suelo tratado mostraron clorosis ligera, necrosis terminal en las hojas y en algunos casos necrosis a nivel del tallo no asociada a la infección por *P. capsici*. Mejoras en el manejo del producto, tales como un riego preliminar o mayor tiempo de aireación podrían mejorar su eficacia.

Los cuatro productos biológicos comerciales evaluados no tuvieron control total de la marchitez pero sí hubo efectos importantes en la reducción de la enfermedad con los tratamientos de Fus out, Natucontrol, Baktillis y Probac solos o en combinación. Resaltan los tratamientos con Baktillis o Fus out con Probac que tuvieron bajos valores de AB-CPS e incrementaron la acumulación de materia seca con respecto al testigo inoculado. La dificultad de microorganismos introducidos para establecerse en la rizósfera de los cultivos, está generalmente asociada a la alta competitividad y adaptación previa de la microflora nativa (Van Veen *et al.*, 1997; Agrios, 2005), lo cual pudo ser un factor determinante de la efectividad limitada de los productos comerciales evaluados, en adición a la posible insuficiente efectividad de las cepas de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp en el control del patógeno (Schippers *et al.*, 1987; Bais *et al.*, 2004; Fernández-Herrera *et al.*, 2007) que contienen estos productos. Sin embargo, cepas de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* pueden favorecer el crecimiento de las plantas cuya rizósfera colonizan (Benhamou *et al.*, 1998; Kloepper *et al.*, 2004; Ezziyyani *et al.*, 2005), por lo que en adición a su capacidad para reducir los niveles de enfermedad, pueden potencialmente contribuir a mejorar el rendimiento del cultivo.

En el presente trabajo fueron muy evidentes los contrastes en la severidad y producción de biomasa en plantas cultivadas en turba-agrolita, con respecto a las cultivadas en suelo, lo cual

a determining factor of the limited effectiveness of the strains of *Trichoderma* sp. and *Bacillus* sp in the control of the pathogen (Schippers *et al.*, 1987; Bais *et al.*, 2004; Fernández-Herrera *et al.*, 2007) that contain these products. However, the strains of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* could improve the growth of the plants whose rhizosphere they colonize (Benhamou *et al.*, 1998; Kloepper *et al.*, 2004; Ezziyyani *et al.*, 2005). Therefore, in addition to their ability to reduce the levels of the disease, they could potentially contribute to the yield improvement of the crop.

The contrasts of the severity and production of biomass in plants cultivated in peat-agrolite were very evident in this work, especially in regards to the ones cultivated in the soil, which was clearly associated with the differences in the nutritional balance achieved in each substrate; however, it is possible that the native biota of the soils used in our study had a relevant part, given the absence of disease in non-inoculated soils and the evident decrease of AUSPC when the plants were cultivated in soil. Early reports have highlighted the importance of this nutritional balance (Duffy *et al.*, 1997) and the importance of the organisms in the soil in the suppression of both oomycetes and other pathogens (Wardle, 2002; Yumusa and Newton, 2003). They are, therefore, factors worth considering in the process of integration of an integrated management system of the disease for the conditions of Vega de Metztlán, Hidalgo.

The results of this research indicated that cultivars CP 1261, CP 1264 and CP 1305 were the most resistant to the pathogen and that the treatments with metalaxyl, fosetyl aluminum or propamocarb, metalaxyl alternated with fosetyl aluminum or with propamocarb completely controlled the wilt, whereas the treatments with Baktillis (*Bacillus subtilis*) alone or combined with Fus Out (*Trichoderma harzianum*) or Probac (*B.*

estuvo evidentemente asociado con diferencias en el balance nutricional obtenible en cada sustrato, pero posiblemente la biota nativa de los suelos utilizados en nuestro estudio jugó un papel relevante, dada la ausencia de la enfermedad en suelos no inoculados y la reducción notable del ABCPS cuando las plantas fueron cultivadas en suelo. Reportes previos han resaltado la importancia de este balance nutricional (Duffy *et al.*, 1997) y la importancia de los organismos del suelo en la supresión tanto de oomicetos como de otros patógenos (Wardle, 2002; Yunusa y Newton, 2003), por lo que son factores a considerar en el proceso de definición de un sistema de manejo integrado de la enfermedad para las condiciones de la Vega de Metztlán, Hidalgo.

Los resultados de la presente investigación indicaron que los cultivares CP 1261, CP 1264 y CP 1305 fueron los más resistentes al patógeno y que los tratamientos con metalaxil, fosetil aluminio o propamocarb, metalaxil alternado con fosetil aluminio o con propamocarb controlaron totalmente la marchitez, mientras que los tratamientos con Baktillis (*Bacillus subtilis*) solo o en combinación con Fus Out (*Trichoderma harzianum*) o Probac (*B. subtilis*) únicamente redujeron la severidad de la enfermedad.

LITERATURA CITADA

Agrios GN. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Academic Press. New York, USA. 922p.

Akgül DS and Mirik, M. 2008. Biocontrol of *Phytophthora capsici* pepper plants by *Bacillus megaterium* strains. Plant Pathology 90:29-34.

Andrés A, JL., Rivera MA and Fernández PJ. 2005. Resistance of pepper germplasm to *Phytophthora capsici* isolates collected in northwest Spain. Spanish Journal of Agricultural Research. 3:429-436.

Bais HP, Fall R and Vivanco JM. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiology 134: 307-319.

Barnett HL and Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4a. ed. American Phytopathology Society, MN. 217 p.

subtilis) only reduced the severity of the disease.

~~~~~ Finaliza la versión en Inglés ~~~~~

Benhamou N, Kloepper JW and Tuzum, S. 1998. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. Planta 204:153-168.

Booth C. 1977. *Fusarium*. Laboratory guide to the identification of the major species. Commonwealth Mycological Institute. Surrey, England. 58 p.

Campbell CL and Madden LV. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley and Sons, New York. 532 p.

Cao ZP, Yu YL, Chen GK and Dawson R. 2004. Impact of soil fumigation practices on soil nematodes and microbial biomass. Pedosphere 14:387-393.

Duffy BK, Ownley BH and Weller DM. 1997. Soil chemical and physical properties associated with suppression of take-all of wheat by *Trichoderma koningii*. Phytopathology 87:1118-1124.

Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathology Society, MN. 562 p.

Ezziyyani M, Requena MA y Candela MA. 2005. Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento. Anales de Biología. 27:143-154.

Fernández-Herrera E, Acosta-Ramos M, Ponce-González F y Manuel-Pinto V. 2007. Manejo biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. y *Rhizoctonia solani* Kühn en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Mexicana de Fitopatología 25:35-42.

Gallegly ME and Hong M. 2008. *Phytophthora* identifying species by morphology and DNA fingerprints. American Phytopathology Society, MN. 158 p.

García-Rodríguez MR, Chiquito-Almanza E, Loeza-Lara D, Godoy-Hernández H., Villordo PE, Pons-Hernández JL, González-Chavira MM y Anaya-López L. 2010. Producción de chile ancho injertado sobre criollo de Morelos 334 para el control de *Phytophthora capsici*. Agrocienca. 44: 701-709.

González-Pérez E, Yañez-Morales MJ, Santiago-Santiago V y Montero-Pineda A. 2004. Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados, en Tlacoatepec de José Manzo, el Verde, Puebla. Agrocienca 38:653-661.

González-Real MM, Baille A and Liu HQ. 2008. Influence of fruit load on dry matter and N-distribution in sweet pepper plants. Scientia Horticulturae 117: 307-315.

Granke LL, Quesada-Ocampo L, Lamour K and Hausbeck MK. 2012. Advances in research on *Phytophthora capsici*

- on vegetable crops in the United States. *Plant Disease* 96:1588-1600.
- Gumpertz ML, Graham JM and Ristaino JB. 1997. Autologistic model of spatial pattern of *Phytophthora* epidemics in bell pepper: Effects of soil variables on disease presence. *Journal of agricultural, biological and environmental statistics*. 2:131-156.
- Hu J, Hong C, Stromberg EL and Moorman GW. 2007. Effects of propamocarb hydrochloride on mycelial growth, sporulation, and infection by *Phytophthora nicotianae* isolates from Virginia nurseries. *Plant Disease* 91:414-420.
- Kloepper JW, Ryu CM and Zhang S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259-1266.
- Larkin RP, Gumpertz ML and Ristaino, J. B. 1995. Geostatistical analysis of *Phytophthora* epidemics in commercial bell pepper fields. *Phytopathology* 84:191-203.
- Mathre DF, Cook RJ and Callan NW. 1999. From discovery to use. Traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. *Plant Disease* 83:972-983.
- Morán-Bañuelos SH, Aguilar-Rincón VH, Corona-Torres T y Zavaleta-Mejía, E. 2010. Resistencia a *Phytophthora capsici* LEO. de chiles nativos del sur de Puebla, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33: 21-26.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2014. Genbank. En: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. (Consulta marzo 2015).
- Pineda J, Hernández A, González A, Barrientos V, Nass H, Gil E. 2005. Técnica de inoculación rápida y eficiente para la evaluación de materiales de maíz ante *Rhizoctonia solani* Kühn. *Bioagro* 17:93-98.
- Raupach GS and Kloepper JW. 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* 88:1158-1164.
- Ristaino BG and Johnston SA. 1999. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. *Plant Disease*. 83:1080-1089.
- Sambrook J and Russell DW. 2001. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. 3era. ed. 1:1.32-1.34. Cold Spring Harbour Lab. Press, New York.
- Sanogo S. 2003. Chile pepper and the threat of wilt diseases. Online. *Plant Health Progress* doi: 10.1094/PHP-2003-0430-01-RV.
- Sanogo S. 2006. Predispositional effect of soil water saturation on infection of chile pepper by *Phytophthora capsici*. *HortScience* 41:172-175.
- Schippers B, Baker AW and Bakker PAHM. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review Phytopathology* 25: 339-358.
- Silva-Rojas HV, Fernández-Pavía SP, Góngora-Canul C, Macías-López BC y Ávila-Quezada, G.D. 2009. Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27:134-147.
- Singh A, Rohilla R, Singh US, Savary S, Willocquet L and Duveiller E. 2002. An improved inoculation technique for sheath bight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24:65-68.
- Sneh B, Burpee L and Ogoshi A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. American Phytopathology Society, MN. 133 p.
- Soria FMJ. 1993. Producción de hortalizas en la Península de Yucatán. ITA. Centro de investigaciones y Graduados Agropecuarios. Conkal, Yucatán. 303 p.
- Steel RGD, Torrie JH, Dickey DA. 1997. Principles and procedures of statistics a biometric approach. 3rd ed. McGraw-Hill Series in probability and statistics. 666 p.
- Van Veen JA, Van Overbeek LS and Van Elsas JD. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 61:121-135.
- Velásquez VR, Medina AMM y Luna RJJ. 2001. Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz del chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19: 175-181.
- Villar-Luna E, Reyes-Trejo B, Rojas-Martínez RI, Gómez-Rodríguez O, Hernández-Anguiano AM y Zavaleta-Mejía E. 2009. Hypersensitive response in foliage of chili pepper CM-334 resistant to *Phytophthora capsici* infected by *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 39:143-155.
- Wardle DA. 2002. *Communities and ecosystems: Linking the aboveground and belowground components*. Princeton University Press, Princeton, NJ, USA. 408 p.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp: 315-322 *In*: Innis MA, Gelfand DF, Shinsky JJ, White TJ. (ed). *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego.
- Yunusa IAM and Newton PJ. 2003. Plants for amelioration of subsoil constraints and hydrological control: The primer-plant concept. *Plant Soil* 257:261-281.

# ***Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control**

## ***Lasiodiplodia theobromae* in Agricultural Crops in México: Taxonomy, Host, Diversity and Control**

Paola Alejandra Picos-Muñoz, Raymundo Saúl García-Estrada, Josefina León-Félix, Adriana Sañudo-Barajas y Raúl Allende-Molar. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Coordinación Culiacán. Carr. A Eldorado Km 5.5. Campo El Diez, Culiacán, Sinaloa. CP 80110. Correspondencia: (rallende@ciad.mx).

**Recibido:** Julio 22, 2014      **Aceptado:** Diciembre 25, 2014

Picos Muñoz PA, García Estrada RS, León Felix J, Sañudo Barajas A y Allende Molar R. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 54-74.

**Resumen.** El hongo *Lasiodiplodia theobromae* es el agente causal de numerosas enfermedades de plantas en una gran variedad de hospederos. Los cultivos hortofrutícolas son particularmente sensibles a la infección por este hongo. Aunque, en México *L. theobromae* está asociado con la muerte descendente y pudrición de frutos como mango, uva, papaya, rambután, zapote y cítricos aún es escaso el número de reportes relacionados con enfermedades causadas en diferentes especies vegetales. La taxonomía de *L. theobromae* ha mostrado importantes progresos, con la caracterización de las regiones espaciadoras intergénicas y factor de elongación 1 alfa se ha podido esclarecer su ubicación filogenética y su diferenciación con especies crípticas, lo que ha incrementado los reportes en nuevos huéspedes vegetales. El objetivo de esta revisión es el dar a conocer el estatus de *L. theobromae* en México.

**Abstract.** *Lasiodiplodia theobromae* is the causal agent of numerous plant diseases in a wide variety of hosts. Fruit and vegetable crops are particularly susceptible to infection by this fungus. Although in Mexico, *L. theobromae* is associated with dieback and fruit rot in fruits such as mango, grapes, papaya, rambutan, sapote mamey and citrus fruit, the number of reports of this fungus related to diseases in different plant species is still few. The taxonomy of *L. theobromae* has shown important progress, with the characterization of the intergenic spacer regions and the elongation factor 1 alpha, phylogenetic location and cryptic species differentiation have been clarified and an increase of reports in new plant hosts has been made. Thus, the objective of this review is to present the status of *L. theobromae* in Mexico.

**Key words:** *Botryosphaeriaceae*, dieback, fruit rot, stem-end rot

*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. is the species type of the genus *Lasiodiplodia*, which is a fungus that was described for the first time around 1890 by Saccardo, affecting cocoa



**Palabras clave:** *Botryosphaeriaceae*, muerte descendente, pudrición de frutos, pudrición del pedúnculo.

*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. es la especie tipo del género *Lasiodiplodia* es un hongo que fue descrito por primera vez alrededor de 1890 por Saccardo, afectando frutos de cacao (*Theobromae cacao*) en Ecuador (Crous y Palm, 1999). Este hongo es cosmopolita y tiene un amplio rango de hospederos, incluidos monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas, especialmente de los trópicos y subtrópicos. Es un hongo pleomórfico y ubicuo, por lo cual ha tenido más de un sinónimo (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

Las enfermedades ocasionadas por este patógeno incluyen muerte descendente, cáncer, gomosis, tizón de la hoja, pudrición de raíz en plantas maderables y cultivos (Pitt y Hocking, 2009; Shahbaz *et al.*, 2009). *L. theobromae* es saprófito pero se le considera un patógeno latente, encontrándose como endófito en tejidos sanos de la planta, convirtiéndose en patógeno cuando el hospedero está debilitado o estresado (Rubini *et al.*, 2005; Mohali *et al.*, 2005); también se ha reportado como un patógeno oportunista de humanos causando infecciones subcutáneas, oculares y de órganos internos (Rebell y Forster, 1976; Maslen *et al.*, 1996; Summerbell *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2008). A nivel mundial existen registros de *L. theobromae* afectando cultivos frutales de mango (Jonhson, 1992), aguacate (Pegg *et al.*, 2003), papaya (Queiroz *et al.*, 1997), plátano (Alves *et al.*, 2008), rambután (Sivakumar *et al.*, 1997), litchi (Liu *et al.*, 2005), uva (van Niekerk *et al.*, 2004), guanábana (Lutchmeah, 1988), anacardo (Cardoso *et al.*, 2002), cítricos, duraznos (Damn *et al.*, 2007) y longan (Serrato-Días *et al.*, 2014) entre otros, causando pérdidas económicas en las distintas etapas de la producción.

podis (*Theobromae cacao*) en Ecuador (Crous and Palm, 1999). This fungus is highly diverse and has a large range of hosts, including monocotyledons, dicotyledons and gymnosperms, especially from the tropics and subtropics. It is a pleomorphic and ubiquitous fungus, as such it has had more than one synonym (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

The diseases caused by this pathogen include dieback, cancer, gummosis, leaf blight, and root rot on woody plants and crops (Pitt and Hocking, 2009; Shahbaz *et al.*, 2009). *L. theobromae* is saprophytic but is considered a latent pathogen, found as an endophyte in healthy plant tissue and becoming a pathogen when the host is debilitated or stressed (Rubini *et al.*, 2005; Mohali *et al.*, 2005). It has also been reported as an opportunist pathogen in humans causing subcutaneous, ocular infections as well as infections of the internal organs (Rebell and Forster, 1976; Maslen *et al.*, 1996; Summerbell *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2008). At a global level there are records of *L. theobromae* affecting fruit crops such as mango (Johnson, 1992), avocado (Pegg *et al.*, 2003), papaya (Queiroz *et al.*, 1997), banana (Alves *et al.*, 2008), rambutan (Sivakumar *et al.*, 1997), lychee (Liu *et al.*, 2005), grapes (van Niekerk *et al.*, 2004), soursop (Lutchmeah, 1988), cashew (Cardoso *et al.*, 2002), citrus fruit, peaches (Damn *et al.*, 2007) and longan (Serrato-Días *et al.*, 2014) among others, causing economical loses in various stages of production.

In recent years, its phylogenetic relation with cryptic species has been established through the analysis of DNA in fragments of the intergenic spacer regions (ITS) and the elongation factor 1 alpha (EF-1 $\alpha$ ), which has allowed for clearer results of its location with regard to similar or closely related species (Pavlic *et al.*, 2004); Alves *et al.*, 2008; Abdollahzadeh *et al.*, 2010).



En años recientes se ha establecido su relación filogenética con especies crípticas a través del análisis de ADN en fragmentos de las regiones espaciadoras intergénicas (ITS) y el factor de elongación 1 alfa (EF-1 $\alpha$ ), lo que ha permitido resultados más claros de su ubicación en relación a especies similares o cercanamente relacionadas (Pavlic *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2008; Abdollahzadeh *et al.*, 2010).

La etiología de la enfermedad es crucial para estudios epidemiológicos y para una mejor comprensión de la distribución e importancia de este hongo, así como para establecer estrategias y tratamientos de control efectivo. El objetivo de este escrito es describir el estatus de *L. theobromae* afectando distintos cultivos frutales y maderables en México así como la compilación de los resultados publicados de los cultivos afectados enfocándose en aspectos de biología, patogenicidad, epidemiología y estrategias de control de este hongo en nuestro país.

### TAXONOMÍA

El hongo *Lasiodiplodia theobromae* se clasifica dentro de los Ascomycetos en el orden Botryosphaerales y en la familia Botryosphaeriaceae (Schoch *et al.*, 2006; Slippers *et al.*, 2013); presenta un estado sexual (teleomorfo), poco común *Botryosphaeria rhodina*. Sin embargo no existen descripciones recientes de su estado sexual, por lo cual se ha reportado que éste se encuentra perdido (Phillips *et al.*, 2008). El estado sexual de este hongo necesita clarificarse, los resultados que se tienen hasta ahora han sido inconclusos dado que no se han encontrado subsecuentes reportes que confirmen esta conexión (Alves *et al.*, 2008).

*L. theobromae* tuvo como sinónimo a *Diplodia theobromae* (Alvarez, 1976; Denman *et al.* 2000). En años recientes estudios filogenéticos, basados en las regiones ITS, realizados por Zhou y Stanosz

The etiology of the disease is crucial for epidemiological studies and for a better understanding of the distribution and importance of this fungus, as well as to establish strategies and treatments for its effective control. The objective of this article is to describe the status of *L. theobromae* affecting various fruit and woody crops in Mexico as well as to compile the published results of the affected crops focusing on the aspects of biology, pathogenicity, epidemiology and strategies of control for this fungus.

### TAXONOMY

The fungus *Lasiodiplodia theobromae* is classified within the Ascomycota in the order Botryosphaerales and the family Botryosphaeriaceae (Schoch *et al.*, 2006; Slippers *et al.*, 2013). It shows an uncommon sexual state (teleomorph) *Botryosphaeria rhodina*; however, there are no recent descriptions of its sexual state, which is why it has been reported that this information has been lost (Phillips *et al.*, 2008). The sexual state of this fungus needs to be clarified, the results up until now have been inconclusive given that there have not been any subsequent reports that confirm this connection (Alves *et al.*, 2008).

*Diplodia theobromae* was known as a synonym of *L. theobromae* (Alvarez, 1976; Denman *et al.*, 2000). In recent years, phylogenetic studies based on the ITS regions, carried out by Zhou and Stanosz (2001), Slippers *et al.* (2004) and Phillips *et al.* (2008), show that the clades of these two genera are in fact separate. Furthermore, morphologically the two genera are clearly distinct. For example, the marks of the conidia are only present in *Lasiodiplodia* in the same manner the sexual stage, has only been reported in *L. theobromae*. Therefore, there is no reason to consider these two genera as synonyms (Phillips *et al.*, 2013).

(2001), Slippers *et al.* (2004) y Phillips *et al.* (2008) muestran que los clados de estos dos géneros están separados entre sí. Además, morfológicamente los dos géneros son claramente distintos. Por ejemplo, las estrías de los conidios están presentes solo en *Lasiodiplodia* de igual manera la forma sexual, se ha reportado solamente en *L. theobromae*. Por lo anterior, no hay razón para considerar a estos dos géneros como sinónimos (Phillips *et al.*, 2013).

Por mucho tiempo se consideró a *Botryodiplodia theobromae* Pat. (1892) como el basionimo de *L. theobromae*, el cual fue descrito en la planta *Theobroma cacao* en Ecuador; sin embargo, Crous y Palm (1999) examinaron el tipo original conservado en Pennsylvania y encontraron un ascomiceto valsoide por lo que el nombre de *Botryodiplodia* (Sacc.) Sacc. se considera *nomen dubium* (nombre incierto). Por otro lado, no se ha encontrado el holotipo de *L. theobromae* en herbario alguno (Pavlic *et al.*, 2004) con lo que se presume que se perdió con el tiempo. Hecho por el cual, Phillips *et al.* (2013) designaron un neotipo aislado de un fruto indefinido del arrecife de coral de la costa este en Papua Nueva Guinea, lejos de la localidad del holotipo y del substrato original (planta de cacao), considerando este neotipo como una cepa de referencia para *L. theobromae*.

En relación a su teleomorfo, a través del tiempo la taxonomía superior del género *Botryosphaeria* (estado sexual de *Lasiodiplodia theobromae*) ha tenido diferentes modificaciones. Slippers *et al.* (2013) indica que en un inicio el género fue asignado a la familia *Melogrammataceae*, dentro del orden Sphaerales; posteriormente, fue situado en la familia *Pseudosphaeriaceae* que agrupaba taxones con un solo lóculo y ascostromata multiascal, dentro del orden Dothideales, posteriormente se creó la subfamilia *Botryosphaerieae* y fue colocado en ésta, pero no se le ubicó dentro de un orden. Un año después, se le designó en el orden Myriangiales,

For a long time *Botryodiplodia theobromae* Pat. (1892) was considered as the basionym of *L. theobromae*, which was described in the *Theobroma cacao* plant in Ecuador; however, Crous and Palm (1999) examined the original type conserved in Pennsylvania and found an Ascomycota valsoide by which the name *Botryodiplodia* (Sacc.) Sacc. is considered *nomen dubium* (uncertain name). On the other hand, the holotype of *L. theobromae* has not been found in any herbarium (Pavlic *et al.*, 2004), as such it is presumed to have been lost with time. Phillips *et al.* (2013) designated a neotype isolated from an undefined fruit from the coral reef of the east coast in Papua New Guinea, far from the local of the holotype and the original substrate (cocoa tree), considering this neotype a strain of reference for *L. theobromae*.

Regarding its teleomorph, with the passing of time the superior taxonomy of the genus *Botryosphaeria* (sexual state of *Lasiodiplodia theobromae*) has had various modifications. Slippers *et al.* (2013) indicate that at the beginning the genus was assigned to the family *Melogrammataceae*, within the order Sphaerales; subsequently, it was situated in the family *Pseudosphaeriaceae* that grouped taxa with a single loculus and multiscale ascostromata, within the order Dothideales; following that, the subfamily *Botryosphaerieae* was created and it was placed here; however, it was not placed within an order. A year later, it was assigned to the order Myriangiales, and subsequently the subclass Dothideineae was created within the new order Pseudosphaerales and the new family *Botryosphaeriaceae*. One of the main reasons for this reorganization in the classification of *Botryosphaeria* was because of the confusion with regard to the ontogeny and morphology of true perithecia, ascostromata and interstitial tissue (Denman *et al.*, 2000; Slippers *et al.*, 2013).

posteriormente se creó la subclase Dothideineae dentro del nuevo orden Pseudosphaeriales y la nueva familia *Botryosphaeriaceae*. Una de las razones principales de esta reorganización en la clasificación de *Botryosphaeria* fue la confusión respecto a la ontogenia y morfología de verdaderos peritecios, ascostromata y tejido intersticial (Denman *et al.*, 2000; Slippers *et al.*, 2013).

En los últimos años, debido principalmente a la disponibilidad de herramientas moleculares basadas en el ADN recombinante, ha surgido una taxonomía más sólida para este grupo de hongos. Hasta hace una década la posición del género en la clasificación más alta de los ascomicetes no había sido resuelta (Denman *et al.*, 2000). Estudios filogenéticos señalan la posición de la familia *Botryosphaeriaceae* en la clase Dothiideomycetes, situándola dentro de Botryosphaeriales, un nuevo orden e independiente de los órdenes Pleosporales y Dothideales (Crous *et al.*, 2006). Actualmente se reconocen 6 familias dentro de este orden: *Botryosphaeriaceae* (con 17 géneros), *Phyllostictaceae* (*Phyllosticta*), *Planistromellaceae* (*Kellermania*), *Aplosporellaceae* (*Aplosporella*, *Bagnisiella*), *Melanopsaceae* (*Melanops*) y *Saccharataceae* (*Saccharata*) (Slippers *et al.*, 2013).

Los análisis basados en la secuenciación de ADN han originado cambios significantes en la nomenclatura, identificación y circunscripción de especies en *Botryosphaeriaceae*. Estos cambios son resultados de la implementación de una sola nomenclatura para todas las formas (sexual y asexual) de una especie (Hawksworth *et al.*, 2011), incluyendo la descripción de especies crípticas basadas en las secuencias de ADN donde los caracteres morfológicos no son suficientes para este propósito (Pavlic *et al.*, 2009; Sakalidis *et al.*, 2011). Estudios contemporáneos de la familia *Botryosphaeriaceae* apoyan esta moción, basándose en que las características morfológicas usadas típicamente

In the last couple of years, mainly due to the availability of molecular tools based on the recombinant DNA, a more solid taxonomy has emerged for this group of fungi. Until a decade ago, the position of the genus in the highest classification of the ascomycetes had not been solved (Denman *et al.*, 2000). Phylogenetic studies show the position of the family *Botryosphaeriaceae* in the class Dothiideomycetes, placing it within Botryosphaeriales, a new order and independent from the orders Pleosporales and Dothideales (Crous *et al.*, 2006). Currently 6 families are recognized within this order: *Botryosphaeriaceae* (with 17 genera), *Phyllostictaceae* (*Phyllosticta*), *Planistromellaceae* (*Kellermania*), *Aplosporellaceae* (*Aplosporella*, *Bagnisiella*), *Melanopsaceae* (*Melanops*) and *Saccharataceae* (*Saccharata*) (Slippers *et al.*, 2013).

The analyses based on the DNA sequencing have originated significant changes in the nomenclature, identification and circumscription of species in *Botryosphaeriaceae*. These changes are the results of the implementation of a single nomenclature for all forms (sexual and asexual) of a species (Hawksworth *et al.*, 2011), including the description of cryptic species based on the DNA sequences, where the morphological characters are not enough for this purpose (Pavlic *et al.*, 2009; Sakalidis *et al.*, 2011). Contemporary studies of the *Botryosphaeriaceae* family support this motion, based on the morphological characteristics typically used for the classification of species (form of the conidia or ascospores and its dimensions, septation and pigmentation) frequently not being too reliable. The ecological and geographical data are also difficult to interpret when some species have various hosts, and a host has various species (Slippers *et al.*, 2009). Therefore, the majority—if not all—of the taxa include the DNA sequence and its phylogenetic inference in order to redefine

para la clasificación de especies (forma del conidio o ascosporas y sus dimensiones, septación y pigmentación) son frecuentemente poco fiables. También los datos ecológicos y geográficos son difíciles de interpretar cuando algunas especies tienen varios huéspedes, y un huésped tiene distintas especies (Slippers *et al.*, 2009). Por esta razón la mayoría, si no es que todos, los taxa incluyen la secuencia de ADN y su inferencia filogenética para redefinir estas clasificaciones (Slippers *et al.*, 2013). Por ejemplo, Liu *et al.* (2012) se basaron en la amplificación y secuenciación de distintas regiones del genoma usando los oligonucleótidos NS1 y NS4, LROR y LR5, ITS4 e ITS5, EF2-728 F/ EF2-968F y Bt2a y Bt2b (Que amplifican la región de la subunidad pequeña del gen ribosomal nuclear, un segmento de la subunidad grande del gen RNA ribosomal, las regiones espaciadoras intergénicas del rDNA, un segmento del factor de elongación 1-alfa y un segmento del gen de  $\beta$ -tubulina, respectivamente) con el objetivo de reordenar a la familia *Botryosphaeriaceae* aceptando 29 géneros y 1485 especies, aclarando que faltan especies no descritas aún y algunos complejos de especies. También se reordenó el género *Macrovalsaria* en esta familia, el cual es monotípico, es decir con una sola especie *M. megalospora*, la cual se encuentra solamente en estado sexual y esta genéticamente cercana a *Lasiodiplodia* spp. Algunos consideran este género como el estado sexual de *Lasiodiplodia* spp. pero aún faltan estudios más profundos para confirmar esta proposición (Liu *et al.*, 2012).

Cambios recientes en la taxonomía de hongos, según la nomenclatura de algas, hongos y plantas (Código Melbourne), establecen solo un nombre para cada especie de hongo, ya que durante más de 100 años el código permitió los nombres de la fase asexual y la sexual de una sola especie (Rico, 2011). El género *Lasiodiplodia* se considera válido y se encuentra en la lista pendiente de aprobación por el comité de nomenclatura de hongos, lo cual

these classifications (Slippers *et al.*, 2013). For example, Liu *et al.* (2012) based themselves in the amplification and sequencing of the various regions of the genome using the oligonucleotides NS1 and NS4, LROR and LR5, ITS4 and ITS5, EF2-728 F/ EF2-968F and Bt2a and Bt2b (that amplify the region of the small subunit of the nuclear ribosomal gene, a segment of the large subunit of the ribosomal RNA gene, the intergenic spacer regions of the rDNA, a segment of the elongation factor 1-alpha and a segment of the  $\beta$ -tubulin gene, respectively) with the objective of rearranging the *Botryosphaeriaceae* family, accepting 29 genera and 1485 species, clarifying that species not yet described and some complex of species are still missing. The genus *Macrovalsaria* was also rearranged into this family, which is monotypic, that is to say with a single specie *M. megalospora*, which is only found in a sexual state and genetically close to *Lasiodiplodia* spp. Some consider this genus as the sexual state of *Lasiodiplodia* spp.; however, more in depth studies would be needed to confirm this proposal (Liu *et al.*, 2012).

Recent changes in the taxonomy of fungi, according to the nomenclature of algae, fungi and plants (Melbourne Code), establish only one name for each species of fungi, given that during more than 100 years the code allowed the names of the asexual and sexual phase of a single species (Rico, 2011). The genus *Lasiodiplodia* is considered valid and is found on the list pending approval by the committee of fungi nomenclature, which could occur in the next international congress of botany in China in 2017 (Kirk *et al.*, 2013; Wijayawardene *et al.*, 2014).

## BIOLOGY

**Physiology and Morphology.** The main characteristic that distinguishes the genus

podría ocurrir en el próximo congreso internacional de botánica en China en el año 2017 (Kirk *et al.*, 2013; Wijayawardene *et al.*, 2014).

## BIOLOGÍA

**Fisiología y Morfología.** La principal característica que distingue al género *Lasiodiplodia* de otros géneros cercanamente relacionados es la presencia de picnidios, paráfisis y estriaciones longitudinales en conidios maduros. Cerca de 20 especies han sido descritas en base a la morfología de conidios y paráfisis. Las descripciones más recientes de estas especies, aparte de la morfología, se basan en la secuenciación de las regiones espaciadoras intergénicas del rDNA (ITS) y factor de elongación 1 alfa (EF-1) (Damm *et al.*, 2007; Netto *et al.*, 2014).

La morfología de su ascocarpo es de color café oscuro a negro, agregado, con pared gruesa de color café oscuro y hialino en capas internas, de 250-400 µm de diámetro. El asca es bitunicada, estipitada, con 8 esporas, de 90-120 µm de longitud. Las ascosporas son biseriadas, hialinas, aseptadas de 30-35 x 11-14 µm. El conidiomata es estromático, simple o agregado, inmerso en el hospedero y una vez maduro emerge de éste, de color café oscuro, unilocular, de pared gruesa o delgada de color marrón, con frecuencia setoso, de hasta 5 mm de ancho, ostiolo central, único, papillado. Paráfisis hialinas, cilíndricas, tabicadas, ocasionalmente ramificadas con los extremos redondeado hasta 55 µm de largo y 3-4 µm de ancho (Phillips *et al.*, 2013).

Los conidióforos son hialinos, simples, algunas veces septados, rara vez ramificados, cilíndricos. Las células conidiogénicas son hialinas, de pared gruesa, lisas, cilíndricas a sub-obpiriformes, holoblasticos, con una o dos anillaciones. Los conidios son subovoides a elipsoidales, con ápices ampliamente redondeados, que se estrechan para trincar la base, más ancha a mediados del tercio superior,

*Lasiodiplodia* from other closely related genera is the presence of pycnidia, paraphyses and longitudinal striations in mature conidia. Around 20 species have been described based on the morphology of conidia and paraphyses. The most recent descriptions of these species, other than the morphology, are based on the sequencing of the intergenic spacer regions of the rDNA (ITS) and elongation factor 1 alpha (EF-1) (Damm *et al.*, 2007; Netto *et al.*, 2014).

The morphology of its ascocarpo is a dark brown to black, aggregate, with a thick dark brown wall and hyaline in internal layers, of 250-400 µm in diameter. The asci is bitunicate, stipitate, with 8 spores, of 90-120 µm longitude. The ascospores are biseriated, hyaline, aseptated of 30-35 x 11-14 µm. The conidiomata is stromal, simple or aggregate, immersed in the host and once mature, it emerges a dark brown color, unilocular, thick or thin brown wall, with setoso frequency, up to 5 mm wide, central ostiolo, unique, papillado. Paraphyses hyaline, cylindrical, partitioned, occasionally branched with the ends rounded up to 55µm long and 3-4 µm wide (Phillips *et al.*, 2013).

The conidiophore are hyaline, simple, sometimes septated, rarely branched, cylindrical. The conidiogenous cells are hyaline, of a thick wall, smooth, cylindrical to sub-obpiriforms, holoblastic, with one or two rings. The conidia are subvoids to ellipsoidal, with apex amply rounded, that narrow to truncate at the base, wider mid-upper third, of thick walls, with a granular content, at first hyaline and aseptated, turning a dark brown once mature, with 1 septum, showing deposits of melanin on the interior surface of the wall longitudinally disposed given a striated appearance with measurements 21.5-31.5 x 13-17 µm and one portion of 1.9 Length/Wide (Figure 1) (Pitt and Hocking, 2009; Phillips *et al.*, 2013).

The colonies in the culture medium are moderately dense, with aerial mycelium, beginning

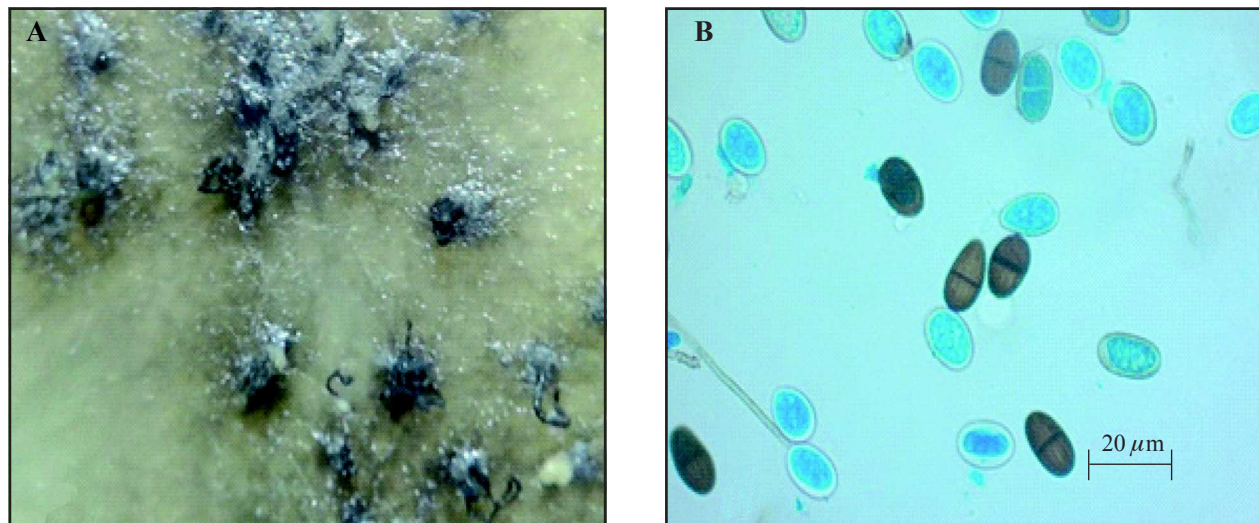


de paredes gruesas, con contenido granular, en un principio hialino y aseptados, convirtiéndose a café oscuro una vez maduros, con 1 septo, presentan depósitos de melanina en la superficie interior de la pared dispuestos longitudinalmente dando una apariencia estriada con medidas de 21.5-31.5 x 13-17  $\mu\text{m}$  y una proporción de 1.9 Largo/Ancho (Figura 1) (Pitt y Hocking, 2009; Phillips *et al.*, 2013).

Las colonias en medio de cultivo son moderadamente densas, con micelio aéreo, inicialmente blancas tornándose gris-olivo a los 7 días y con el tiempo adquieren un color negro. Las temperaturas de crecimiento para *L. theobromae* son 15 °C mínima, 28 °C como óptima y 40 °C como máxima (Slippers *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2008). La esporulación del hongo es favorecida por fotoperiodos de más de 16 horas de exposición de luz lo que permite la formación de picnidios; por el contrario, una exposición menor a 4 horas de luz diaria en un periodo de 23 días inhibe la esporulación del hongo (Perera y Lago, 1986). La presencia de nitrógeno en

white, turning a gray-olive color at 7 days, and with time acquire a black color. The temperature of growth for *L. theobromae* is 15 °C minimum, 28 °C optimally and 40 °C maximum (Slippers *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2008). The sporulation of the fungus is favored by photoperiods of more than 16 hours of light exposure, which allows for the formation of pycnidia; on the contrary, an exposure of less than 4 hours of daily light, in a period of 23 days, inhibits the sporulation of the fungus (Perera and Lago, 1986). The presence of nitrogen in the culture medium favors sporulation; Saha *et al.* (2008) evaluated the concentration of nitrogen in various culture mediums, finding that the potato dextrose agar (PDA) with added tea root extract induces rapid growth and higher mycelium, in addition to a higher concentration of spores than the rest of the evaluated mediums.

For several years, the physiology of the isolates in the separation of species of the genus *Lasiodiplodia* has been controversial. For example,



**Figura 1.** Estructuras de *Lasiodiplodia theobromae* en aislado proveniente de papaya. A) Micelio y picnidios en PDA a 14 días de crecimiento. B) Conidios maduros e inmaduros a 14 días de crecimiento.

**Figure 1.** Structures of *Lasiodiplodia theobromae* in an isolate taken from papaya. A) Mycelia and pycnidia in PDA at 14 days of growth. B) Mature and immature conidia at 14 days of growth.

el medio de cultivo favorece la esporulación; Saha *et al.* (2008) evaluaron la concentración de nitrógeno en distintos medios de cultivo, encontrando que el agar de papa dextrosa (PDA) adicionado con extracto de raíz de té induce a un crecimiento rápido y mayor del micelio, además de una concentración de esporas superior al resto de los medio evaluados. Por muchos años, la fisiología de los aislamientos en la separación de especies del género *Lasiodiplodia* ha sido tema de controversia. Por ejemplo, Alves *et al.* (2008) distinguieron a *L. parva* y *L. pseudotheobromae* de *L. theobromae* basados en la habilidad de las dos primeras de producir un pigmento rosa en medio PDA a 35 °C; también reportaron que *L. pseudotheobromae* era la única que crecía a 10 °C. En contraste, Abdollahzadeh *et al.* (2010) encontraron que *L. theobromae* a 35 °C producía una fuerte pigmentación rosa en PDA, además de que las tres especies crecían a 10 °C. Entonces, las características fisiológicas tienen un valor limitado para determinar la separación de especies ya que existe una gran variabilidad en las características fisiológicas entre los aislamientos de una misma especie.

**Estudios filogenéticos.** Al considerar la similitud en diversas secuencias de ADN, distintos géneros se agruparían con *Lasiodiplodia* al grado de considerarlos sinónimos de éste. Phillips *et al.* (2013) consideran a *Macrovalsaria* en el grupo de este género. Esto también fue señalado por Liu *et al.* (2012), aunque no encontraron suficiente evidencia en las regiones LSU y SSU para realizar este cambio y establecerlo como un sinónimo.

Por otro lado, aunado a la presencia cosmopolita, el amplio número de huéspedes y la variabilidad morfológica de *L. theobromae*, existen varias especies crípticas. Por ejemplo, Pavlic *et al.* (2004) describieron a *L. gonubiensis* Pavlic, Slippers & Wingf en base a la morfología y dimensiones de

Alves *et al.* (2008) distinguieron a *L. parva* and *L. pseudotheobromae* of *L. theobromae* based on the ability of the first two to produce a pink pigment in the PDA medium at 35 °C; they also reported that *L. pseudotheobromae* at 35 °C produced an intense pink pigmentation in the PDA, in addition to the three species growing at 10 °C. Therefore, the physiological characteristics have a limited value to determine the separation of species given that there exists great variability in the physiological characteristics between the isolates of a single species.

**Phylogenetic Studies.** Considering the similarity in diverse DNA sequences, diverse genera would be grouped with *Lasiodiplodia* to the point of considering them synonyms. Phillips *et al.* (2013) considers *Macrovalsaria* in the group of this genus. This was also pointed out by Liu *et al.* (2012), although no sufficient evidence was found in the LSU and SSU regions in order to make this change and establish it as a synonym.

On the other hand, joined to cosmopolitan presence, the ample number of hosts and the morphological variability of *L. theobromae*, various cryptic species exist. For example, Pavlic *et al.* (2004) described *L. gonubiensis* Pavlic, Slippers & Wingf based on the morphology and dimensions of its conidia and on the sequencing of the ITS regions. Subsequently, Burgess *et al.* (2006) described *L. crassispora*, *L. venezuelensis* and *L. rubropurpurea* based on the ITS regions and EF1- $\alpha$  and the morphological characteristics. Other species considered cryptic are *L. parva* and *L. pseudotheobromae* (Alves *et al.*, 2008), which are separated by the size and form of the conidia. In *L. pseudotheobromae* the conidia is larger and more ellipsoidal than in *L. theobromae*. Also, *L. parva* is easily distinguishable from the other two species given that its conidia are smaller. *L. mahajangana*

sus conidios y en la secuenciación de las regiones ITS. Posteriormente, Burgess *et al.* (2006) describieron a *L. crassisporea*, *L. venezuelensis* y *L. rubropurpurea* en base a las regiones ITS y EF1- $\alpha$  y a las características morfológicas. Otras especies que se consideran crípticas son *L. parva* y *L. pseudotheobromae* (Alves *et al.*, 2008), las cuales están separadas por el tamaño y forma del conidio. En *L. pseudotheobromae* el conidio es más grande y elipsoidal que en *L. theobromae*. También, *L. parva* es fácilmente distinguible de las otras dos especies ya que sus conidios son más pequeños. Otra especie que se considera críptica es *L. mahajangana*, la cual es filogenéticamente cercana a *L. theobromae* pero morfológicamente distinta pues la primera tiene conidios relativamente más pequeños de 17.5-11.5  $\mu\text{m}$  (Abdollahzadeh *et al.*, 2010).

Los marcadores SSR se han usado recientemente para examinar genes y genotipos, modos reproductivos y especiación de un número de hongos, incluyendo *Botryosphaeria* spp. y sus anamorfos (Burgess *et al.*, 2006; Mohali *et al.*, 2005). Una investigación sugiere que existen barreras geográficas para el intercambio de genes entre *L. theobromae*, basándose en los marcadores SSR, con aislados de Venezuela, México y Sud África (Mohali *et al.* 2005). Shah *et al.* (2010) analizaron 30 aislados de *L. theobromae* del cultivo de pera en India, encontrando una alta diversidad genética entre los aislados provenientes de distintas zonas geográficas y poca diversidad genética entre los aislados de la misma zona geográfica.

Otros estudios de diversidad genética proponen que dos especies crípticas de *Lasiodiplodia* (*L. theobromae* y *L. pseudotheobromae*), no han sido encontradas y estudiadas en el mismo huésped por lo que no se ha podido establecer si en algún momento ocurrió alguna hibridación entre ambas (Begoude *et al.*, 2010). Al-Sadi *et al.* (2013) encontraron un moderado nivel de diversidad

is another species that is considered cryptic, which is phylogenetically close to *L. theobromae* but morphologically distinct, given that the first has conidia relatively smaller—17.5-11.5  $\mu\text{m}$  (Abdollahzadeh *et al.*, 2010).

The SSR markers have been recently used to examine genes and genotypes, reproductive means and speciation of several fungi, including *Botryosphaeria* spp. and its anamorphs (Burgess *et al.*, 2006; Mohali *et al.*, 2005). An investigation suggests that geographic barriers exist for the exchange of genes between *L. theobromae*, based on the SSR markers, with isolates from Venezuela, Mexico and South Africa (Mohali *et al.*, 2005). Shah *et al.* (2010) analyzed 30 isolates of *L. theobromae* of the pear culture in India, finding a high genetic diversity between the isolates stemming from various geographical zones and little genetic diversity between the isolates of the same geographical zone.

Other studies of genetic diversity propose that two cryptic species of *Lasiodiplodia* (*L. theobromae* and *L. pseudotheobromae*), have not been found and studied in the same host and therefore it has not been possible to establish if, at any moment, any hybridization between them has occurred (Begoude *et al.*, 2010). Al-Sadi *et al.* (2013) found a moderate level of genetic diversity in populations of three species of *Lasiodiplodia* from various hosts and geographical origins, and a high number of genotypes (not specified) of *L. theobromae*, *L. hormozganensis* and *L. iraniensis* in Oman, UAE (United Arab Emirates). They also found that *L. hormozganensis* differed mostly from *L. theobromae* with regard to genetic diversity, suggesting that *L. hormozganensis* was erroneously identified for a long time as *L. theobromae*, due to the only form of identification available being by the morphological characters of the species and that the first is a cryptic species of the second.

genética en poblaciones de tres especies de *Lasiodiplodia* provenientes de distintos huéspedes y orígenes geográficos, y un alto número de genotipos (no especificados) de *L. theobromae*, *L. hormozganensis* y *L. iraniensis* en Omán UAE (Emiratos Árabes Unidos), también encontraron que *L. hormozganensis* difería mayormente con *L. theobromae* en cuanto a diversidad genética, sugiriendo que *L. hormozganensis* por mucho tiempo fue erróneamente identificada como *L. theobromae*, debido a que solo se disponía de identificación por caracteres morfológicos de especies y a que la primera es especie críptica de la segunda.

**Patogenicidad y virulencia.** La especie *L. theobromae* es más virulenta en comparación con otros géneros y especies de la familia *Botryosphaericeae*. Por ejemplo, Úrbez-Torres *et al.* (2008) encontraron que *L. theobromae* es más virulenta que *Diplodia seriata* en el cultivo de vid ya que ocasiona lesiones de mayor tamaño en los tallos inoculados. En frutos de mango *L. theobromae* mostró una virulencia media-alta en comparación con *L. egyptiaca* y *L. pseudotheobromae* (Ismail *et al.*, 2012); en contraste, Marques *et al.* (2013) describió a *L. theobromae* con una virulencia media comparada con *L. hormozganensis* siendo ésta la más virulenta, ocasionando lesiones de 33.6 mm de diámetro en el fruto.

Umezurike (1979) menciona la actividad celulítica del hongo, el cual ataca a la planta de manera similar a un hongo de pudrición suave, usando el almidón y otros sacáridos presentes en el sustrato inicial de la madera antes de la degradación de celulosa y hemicelulosa, aunque no degrada la lignina.

**Sintomatología y epidemiología.** En la pudrición del fruto y del pedúnculo, la enfermedad está condicionada a alta temperatura y humedad relativa

**Pathogenicity and virulence.** The species *L. theobromae* is more virulent in comparison to other genera and species of the family *Botryosphaericeae*. For example, Úrbez-Torres *et al.* (2008) found that *L. theobromae* is more virulent than *Diplodia seriata* in the grapevines crop, given that it caused greater damage to the inoculated stems. In mango fruits, *L. theobromae* showed mid-high virulence in comparison to *L. egyptiaca* and *L. pseudotheobromae* (Ismail *et al.*, 2012); in contrast, Marques *et al.* (2013) described *L. theobromae* with medium virulence compared to *L. hormozganensis* with this being the most virulent, causing damages of 33.6 mm in diameter on the fruit.

Umezurike (1979) mentions the cellulite activity of the fungus, which attacks the plant in a similar manner to a soft rot fungus, using the starch and other saccharides present in the initial substrate of the wood before the degradation of the cellulose and hemicellulose, although it does not degrade the lignin.

**Symptomatology and epidemiology.** In the fruit rot and stem-end rot, the disease is conditioned to high temperatures and relative humidity (Ploetz 2003). The damages caused by *L. theobromae* in mango fruit are initially diffused, aqueous-sunken dispersing from the stalk in the shape of fingerprint projections, which darken and rapidly coalesce around the base of the stalk forming undulating edges. The necrosis occurs below the cuticle, invading the pulp of the fruit and mummifying it. Pycnidia are first observed on the stalk and later on the fruit; furthermore, the injuries may gush a brown ooze (Ploetz, 2003; Ventura *et al.*, 2004).

The main means of entry for *L. theobromae* into the hosts is through the wounds produced by work tools, insects or natural causes (Ploetz, 2003). It has been reported that during periods of rain there is a greater production of spores,



(Ploetz 2003). Las lesiones ocasionadas por *L. theobromae* en frutos de mango son inicialmente difusas, acuosas-hundidas dispersándose desde el pedúnculo en forma de proyecciones de huellas dactilares, las cuales oscurecen y coalescen rápidamente alrededor de la base del pedúnculo formando márgenes ondulados. La necrosis ocurre debajo de la cutícula, invadiendo la pulpa del fruto y llegando a momificarlo. Se llegan a observar picnidios primero sobre el pedúnculo y después sobre el fruto; además, de las lesiones puede fluir un exudado café (Ploetz, 2003; Ventura *et al.*, 2004).

La principal vía de entrada de *L. theobromae* a los hospederos es a través de heridas producidas por herramientas de trabajo, insectos o causas naturales (Ploetz, 2003). Se ha reportado que durante los periodos lluviosos hay mayor producción de esporas las cuales pueden ser diseminadas por las gotas de lluvia y el viento (Vázquez *et al.*, 2009). El hongo coloniza el sistema vascular y avanza por delante de los síntomas visibles (Burgess *et al.*, 2006; Shahbaz *et al.*, 2009). El hongo sobrevive sobre tejidos muertos en el árbol o suelo (Pegg *et al.*, 2003) y especialmente en frutos momificados (Ploetz, 2003). La incidencia de *L. theobromae* está influenciada por la temperatura (mayor a 30° C), al estrés hídrico y bajos niveles de nutrición de la planta (Khanzada *et al.*, 2005). Cuando los frutos son infectados en el árbol, el patógeno puede permanecer quiescente hasta que los frutos maduran. En postcosecha, los frutos pueden ser infectados al colocarlos sobre el suelo después de cosechados o a través del contacto físico de un fruto sano con uno enfermo (Ventura *et al.*, 2004).

## REPORTES EN MÉXICO

*Lasiodiplodia theobromae* ha sido reportado en México causando distintas enfermedades en varios cultivos principalmente frutícolas (Cuadro 1). El

which may be disseminated by raindrops and wind (Vázquez *et al.*, 2009). The fungus colonizes the vascular system and advances ahead of the visible symptoms (Burgess *et al.*, 2006; Shahbaz *et al.*, 2009). The fungus survives on dead tissues on the tree or the ground (Pegg *et al.*, 2003) and especially on mummified fruits (Ploetz, 2003). The incidence of *L. theobromae* is influenced by the temperature (above 30 °C), to hydric stress and low nutrition levels of the plant (Khanzada *et al.*, 2005). When the fruits are infected on the tree, the pathogen may remain latent until the fruit has matured. In post-harvest, the fruits may be infected by being placed on the ground after being harvested or through physical contact of a healthy fruit with a diseased fruit (Ventura *et al.*, 2004).

## REPORTS IN MEXICO

*Lasiodiplodia theobromae* has been reported in Mexico causing various diseases in various crops, mainly fruit producers (Table 1). The oldest report found for this pathogen is that made by Álvarez (1976) affecting the cultivation of cocoa (*Theobroma cacao*). Other crops that he also reported it are: avocado (*Persea americana*), papaya (*Carica papaya*) and rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell.) under the name *Diplodia theobromae*, in sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) such as *Diplodia cacaoicola*, custard apple (*Annona cherimola* Mill) and peach (*Prunus persica*) such as *Diplodia natalensis* causing fruit rot and gummosis, respectively.

The majority of the descriptions for this pathogen have been based on morphological characteristics and it was until this past decade that the identification was supplemented with molecular biology techniques. Between the reports based solely on morphology, there are those made on the cultivation mango (*Mangifera indica*) in



reporte más antiguo encontrado de este patógeno es el realizado por Álvarez (1976) afectando el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*). Otros cultivos que también reporta son: aguacate (*Persea americana*), papaya (*Carica papaya*) y árbol del caucho (*Hevea brasiliensis* Muell.) bajo el nombre de *Diplodia theobromae*, en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) como *Diplodia cacaoicola*, en chirimoya (*Annona cherimola* Mill) y durazno (*Prunus persica*) como *Diplodia natalensis* causando la pudrición del fruto y gomosis, respectivamente.

La mayoría de las descripciones de este patógeno

the state of Veracruz, where the environmental conditions aggravate the situation given that the rain does not permit for the trees to recuperate their foliage (Mosqueda *et al.*, 1996). Also, Romero (1993) made a description of plant pathogenic on agricultural crops in Mexico and reported *B. theobromae* affecting the fruits of mango, custard apple, cotton, yucca, sweet potato and barbasco. Other reports with the name of *Botryodiplodia theobromae* are those of Becerra (1995) affecting the cultivation of mango in Michoacán, Nayarit and Veracruz, where the humidity favors the

**Cuadro 1.** Reportes en México de *L. theobromae* afectando distintos cultivos frutícolas y maderables.

**Table 1.** Reports in México of *L. theobromae* affecting various fruit and woody crops.

| Hospedero                     | Enfermedad                         | Núm. de acceso NCBI | Referencia                                                   |
|-------------------------------|------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------|
| <i>Anacardium occidentale</i> | Necrosis de frutos                 | NR                  | Canales, 2007                                                |
| <i>Anona spp.</i>             | Muerte descendente de ramas        | NR                  | Hernández <i>et al.</i> , 2013                               |
|                               | Pudrición del fruto                | NR                  |                                                              |
| <i>Carica papaya</i>          | Pudrición de frutos                | KC335157            | Mosqueda <i>et al.</i> , 1996<br>Rojo, 2013                  |
|                               |                                    | KC335158            |                                                              |
|                               | Pudrición del pedúnculo            | KC806060            |                                                              |
|                               |                                    | KC806061            |                                                              |
| <i>Carya illinoensis</i>      | Pudrición del fruto                | KC806062            | Alvidrez-Villareal <i>et al.</i> , 2012                      |
|                               |                                    | NR                  |                                                              |
| <i>Citrus aurantium L.</i>    | Muerte de plantas                  | NR                  | Varela <i>et al.</i> , 2013                                  |
| <i>Citrus aurantifolia</i>    | Muerte de ramas                    | NR                  | Varela <i>et al.</i> , 2013                                  |
| <i>Citrus sinensis</i>        | Pudrición de la base del pedúnculo | NR                  | Varela <i>et al.</i> , 2013                                  |
| <i>Hibiscus sabdariffa L.</i> | Manchado de cáliz                  | NR                  | Martínez, 2010                                               |
|                               |                                    | NR                  |                                                              |
|                               | Cáncer de troncos y ramas          | NR                  | Canales, 1998                                                |
|                               |                                    | NR                  |                                                              |
| <i>Mangifera indica</i>       | Muerte descendente                 | NR                  | Becerra, 1995                                                |
|                               |                                    | NR                  |                                                              |
|                               | Pudrición del pedúnculo            | JQ619648            | Mosqueda <i>et al.</i> , 1996<br>Tucuch <i>et al.</i> , 2005 |
|                               |                                    | JQ619649            |                                                              |
| <i>Nephelium lappaceum L.</i> | Pudrición de frutos                | JQ619650            | Sandoval-Sánchez <i>et al.</i> , 2013                        |
|                               |                                    | JQ619651            |                                                              |
|                               | Pudrición del pedúnculo            | FJ478102.1          |                                                              |
|                               |                                    | NR                  |                                                              |
| <i>Persea americana</i>       | Pudrición del pedúnculo            | NR                  | Ochoa-Ascencio <i>et al.</i> , 2007                          |
| <i>Pinus pseudostrobus</i>    | Cáncer de tallo                    | NR                  | Mohali <i>et al.</i> , 2005                                  |
| <i>Pinus sp.</i>              | Cáncer de tallo                    | AY236952            | Slippers <i>et al.</i> , 2004                                |
| <i>Pouteria sapota</i>        | Muerte descendente                 | JQ245975            | Bautista-Baños <i>et al.</i> , 2002                          |
|                               | Pudrición de frutos                |                     | Gómez-Jaimes <i>et al.</i> , 2009                            |
|                               |                                    |                     | Vázquez-López <i>et al.</i> , 2009                           |
| <i>Theobroma cacao</i>        | Pudrición de la mazorca            | NR                  | Álvarez, 1976                                                |
| <i>Vitis vinifera</i>         | Muerte descendente                 | EU012363            | Úrbez-Torres <i>et al.</i> , 2008                            |

NR= No reportado / NR= Not reported.

no han sido en base a características morfológicas y es a partir de la década pasada que se ha complementado la identificación con técnicas de biología molecular. Entre los reportes basados solamente en morfología se encuentran los realizados en el cultivo de mango (*Mangifera indica*) en el estado de Veracruz, donde las condiciones ambientales agravan la situación pues las lluvias no permiten que el árbol recupere su follaje (Mosqueda *et al.*, 1996). También, Romero (1993) realizó una descripción de hongos fitopatógenos en cultivos agrícolas de México y reportó a *B. theobromae* afectando los frutos de los cultivos de mango, chirimoya, algodón, yuca, camote y barbasco. Otros reportes con el nombre de *Botryodiplodia theobromae* son los de Becerra (1995) afectando el cultivo de mango en Michoacán, Nayarit y Veracruz, donde la humedad favorece la aparición del fitopatógeno. Tucuch *et al.* (2005) reportan a *B. theobromae* como el agente causal de la muerte descendente en mango en Campeche, en donde la enfermedad se presenta en mayor intensidad cuando la humedad relativa es mayor al 80% y temperatura entre 26 a 32 °C, manifestándose un secamiento en forma progresiva y descendente con puntos negros en la corteza, en las hojas inicia con lesiones de color gris pardo ocasionando una fuerte defoliación causando la muerte del árbol. Además de los reportes anteriores, también existen otros donde solo se designó como agente causal a *Lasiodiplodia* sp. en marañón (*Anacardium occidentale*) causando necrosis en frutos en Campeche, Quintana Roo y Yucatán (Canales, 2007). También Canales (1998) describe el cáncer de tronco y ramas en mango bajo el nombre de *Botryodiplodia* sp., además de inducir la floración al ocasionar un estrés hídrico en las ramas y provocar un efecto de anillado.

En otros cultivos, basados únicamente en características morfológicas, se incluyen los realizados por Bautista-Baños *et al.* (2002) en donde reportan a

appearance of the phytopathogen. Tucuch *et al.* (2005) reported *B. theobromae* as the causal agent for dieback in mango in Campeche, where the disease presents itself with greater intensity when the relative humidity is above 80 % and a temperature between 26 to 32 °C, presenting a progressive and downward drying with black dots on the bark; grayish brown injuries start on the leaves causing intense defoliation leading to the death of the tree. In addition to the previous reports, there also exist others where *Lasiodiplodia* sp. was only assigned as a causal agent in cashew (*Anacardium occidentale*) causing necrosis in fruits in Campeche, Quintana Roo and Yucatán (Canales, 2007). Canales (1998) also describes the cancer of the trunk and branches in mango under the name *Botryodiplodia* sp., as well as inducing flowering by causing hydrological stress on the branches and causing a girdling effect.

On other crops, based solely on morphological characteristics, are included those made by Bautista-Baños *et al.* (2002) where *B. theobromae* is reported as the causal agent for the rot in mature mammee; Martínez (2010) reports *L. theobromae* affecting roselle (*Hibiscus sabdariffa*); Hernández (2010) reports it as the causal agent for the black spot in rambutan (*Nephelium lappaceum*) in postharvest; Hernández *et al.* (2013) report it associated to dieback in soursop (*Annona* spp) branches, although proof of pathogenicity proving that it is the although it is not yet needed pathogenicity tests to prove it is the causal agent of the disease. Varela *et al.* (2013) describe it as the causal agent in the death of bitter orange plants grafted with various citrus species in nurseries, of the death of branches in Mexican lemon trees and of the stem-end rot in orange fruit.

Between the reports that, in addition to the morphological characteristics, consider some molecular characterization are those of Úrbez-

*B. theobromae* como el agente causal de la pudrición de frutos maduros de mamey; Martínez (2010) reporta a *L. theobromae* afectando flores de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*); Hernández (2010) lo reporta como agente causal de la mancha negra de rambután (*Nephelium lappaceum*) en poscosecha; Hernández *et al.* (2013) lo reportan asociado a la muerte descendente de ramas en guanábana (*Annona* spp), aunque aún son necesarias pruebas de patogenicidad que comprueben que es el agente causal de la enfermedad y Varela *et al.* (2013) lo describen como el agente causal de la muerte de plantas de naranjo agrio injertadas con diferentes especies de cítricos en viveros, de la muerte de ramas en árboles de limón mexicano y de la pudrición del pedúnculo en frutos de naranja.

Entre los reportes que consideran además de las características morfológicas, alguna caracterización molecular se encuentran los de Úrbez-Torres *et al.* (2008), quienes identificaron a *L. theobromae* ocasionando cáncer de la vid en el norte de México y el sur de Estados Unidos de Norteamérica, para su identificación y caracterización se basaron en las regiones ITS1-5.8S e ITS 2, una región parcial del gen de beta tubulina ( $\beta$ - tubulina), y parte del gen del factor de elongación 1 alfa (EF1- $\alpha$ ); Vázquez *et al.* (2009) reportaron a *L. theobromae* afectando varetas de zapote e identificaron al patógeno mediante características morfológicas y la secuenciación de las regiones ITS. En el árbol de la nuez (*Carya illinoensis*), se encontró a *L. theobromae* en asociación a un coleóptero como el agente causal de la pudrición del fruto; el hongo fue identificado en base a las características morfológicas y a la secuenciación de las regiones ITS (Alvidrez-Villarreal *et al.*, 2012). En el cultivo de mango (*Mangifera indica*) se reportó además de *L. theobromae* a *L. pseudotheobromae* (especie críptica de la primera) ocasionando pudrición del pedúnculo y muerte descendente, respectivamente. La identificación de las especies se basó en características morfológicas

Torres *et al.* (2008), who identified *L. theobromae* as causing cancer of the vine in the north of Mexico and the southern United States; for its identification and characterization they based on the ITS1-5.8s and ITS 2 regions, a partial region of the beta-tubulin gene ( $\beta$ -tubulin), and part of the elongation factor 1-alpha gene (EF1- $\alpha$ ). Vázquez *et al.* (2009) reported *L. theobromae* affecting sapote twigs and identified the pathogen through morphological characteristics and the sequencing of the ITS regions. In the pecan tree (*Carya illinoensis*), *L. theobromae* was found in association with a coleopteran as the causal agent for the fruit rot; the fungus was identified based on the morphological characteristics and the sequencing of the ITS regions (Alvidrez-Villarreal *et al.*, 2012). In the mango crop (*Mangifera indica*) in addition to *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae* (cryptic species of the former) was also reported, causing stem rot and dieback, respectively. The identification of the species was based on morphological characteristics and in the amplification and sequencing of the ITS regions (Sandoval-Sánchez *et al.*, 2013). In papaya (*Carica papaya*), Rojo (2013) identified, through morphological characteristics and the sequencing of ITS regions, *L. theobromae* as responsible for the postharvest stem rot.

**Control.** There have been various studies carried out in order to control *L. theobromae* once it has been detected in a crop. Li *et al.* (1995) evaluated fungicides against *L. theobromae* and *Botryosphaeria dothidea* which cause gummosis in peaches and apricot, finding that the fungicide metil-tiofanato inhibited the growth of mycelia, the germination of conidia and controlled the development of the disease in apricot trees; they also reported that the fungicides sprayed, metil-tiofanato 70WP and carbendazim 50WP can be used as an auxiliary treatment in order to prevent the infection of the pathogen.

y en la amplificación y secuenciación de las regiones ITS (Sandoval-Sánchez *et al.*, 2013). En papaya (*Carica papaya*), Rojo (2013) identificó, mediante características morfológicas y la secuencia de regiones ITS, a *L. theobromae* como responsable de pudrición del pedúnculo en poscosecha.

**Control.** Numerosos son los estudios realizados para controlar a *L. theobromae* una vez detectado en el cultivo. Li *et al.* (1995) evaluaron fungicidas contra *L. theobromae* y *Botryosphaeria dothidea* causantes de gomosis en duraznos y albaricoque, encontrando que el fungicidas metil-tiofanato inhibió el crecimiento micelial, la germinación de conidios y controló el desarrollo de la enfermedad en árboles de albaricoque; también reportaron que los fungicidas asperjados, metil-tiofanato 70WP y carbendazima 50WP se pueden usar como tratamiento auxiliar para prevenir la infección del patógeno.

Por otro lado, Tamayo (2007) recomienda la utilización de hipoclorito de calcio y carboxin/captan, a fin de prevenir posibles pudriciones o la manifestación del hongo en el semillero, y antes del almacenamiento se deben sumergir los frutos en una solución fungicida a base de procloraz. También recomienda aspersiones precosecha con fungicidas a base cobre, benomil, metil tiofanato, carbendazim o tiabendazol en forma rotativa a fin de evitar la aparición de poblaciones del patógeno resistentes a los fungicidas.

En un estudio de evaluación de la sensibilidad de *L. theobromae* hacia dos grupos de fungicidas se concluyó que un 91.6 % de 120 aislados provenientes de huertos de papaya fueron sensibles a los ingredientes activos del grupo de carbamatos del tipo metil benzimidazol (benomyl y tiabendazol). En cuanto al grupo de fungicidas del tipo inhibición por demetilación (Imazalil, procloraz, tebuconazol) se encontró gran variabilidad en cuanto al grado de sensibilidad de los aislados analizados

On the other hand, Tamayo (2007) recommends the usage of calcium hypochlorite and carboxin/captan in order to prevent possible rot or the manifestation of the fungus in the nursery, and before storage the fruit must be submerged in a prochloraz-based solution. Tamayo (2007) also recommends a pre-harvest spray of copper-based fungicides, benomyl, metil-tiofanato, carbendazim or tiabendazole on a rotational basis in order to avoid the appearance of pathogen populations resistant to the fungicides.

In a sensibility evaluation study of *L. theobromae* towards two groups of fungicide, it was concluded that 91.6 % of 120 isolates stemming from papaya orchards were sensible to the active ingredients of the carbonates of the methyl benzimidazole type (benomyl and tiabendazole). Regarding the group of fungicides of the inhibition type by demethylation (Imazalil, prochloraz, tebuconazole) great variability was found with regard to the grade of sensibility of the isolates analyzed, concluding that *L. theobromae* is less sensible to this group of fungicides (da Silva *et al.*, 2012).

In post-harvest, Barbosa-Martínez *et al.* (2002) evaluated the effect of ozone, iodine and chlorine in the germination of spores of *L. theobromae* isolating the mango fruit and found that in the application of iodine (500 mg.L<sup>-1</sup>) the germination of spores of *L. theobromae* was of 10 %; meanwhile, in the application of ozone (2.2 mg.L<sup>-1</sup>) and chlorine (360 mg.L<sup>-1</sup>) the germination of spores was of 30 and 40 %, respectively.

Tovar *et al.* (2013) reported that the combination of washing and the subsequent application of tiabendazole reduced the incidence of the diseases caused by *L. theobromae* up to 81 % in sapote graft. The fungicides cyprodinil+fludioxinil, pyraclostrobin+boscalid, prochloraz, tebuconazole, and iprodione were efficient in inhibiting the mycelian growth of *L. theobromae in vitro*.

concluyendo que *L. theobromae* es menos sensible a este grupo de fungicidas (da Silva *et al.*, 2012).

En poscosecha, Barbosa-Martínez *et al.* (2002) evaluaron el efecto del ozono, yodo y cloro en la germinación de esporas de *L. theobromae* aislado de frutos de mango y encontraron que en la aplicación de yodo (500 mg. L<sup>-1</sup>) la germinación de esporas de *L. theobromae* fue de 10%; mientras que con ozono (2.2 mg. L<sup>-1</sup>) y cloro (360 mg. L<sup>-1</sup>) la germinación de esporas fue de 30 y 40%, respectivamente.

Tovar *et al.* (2013) reportaron que la combinación de lavado y posterior aplicación de tiabendazol redujo la incidencia de la enfermedad ocasionada por *L. theobromae* hasta un 81 % en injertos de zapote. Los fungicidas ciprodinil+fludioxinil, piraclostrobin+boscalid, procloraz, tebuconazol, iprodione fueron eficaces para inhibir el crecimiento micelial de *L. theobromae* *in vitro*.

En cítricos, Varela *et al.* (2013) reportan la aplicación de benomyl y compuestos a base de oxiclورو de cobre contra *L. theobromae* en las distintas etapas del cultivo. Canales (1998) sugiere, para el control del cáncer de tronco y ramas de mango, realizar una cirugía en los cánceres hasta eliminar el tejido dañado y aplicar Benlate®, Tecto 60® o Derosal 50® en las heridas. También en mango, en la muerte descendente se recomienda podar las heridas y realizar aspersiones de fungicidas a base de cobre cada 15-20 días, también se puede aplicar los productos Captán, Maneb, Zineb y Benomyl, desde el inicio de la floración hasta un mes antes de la cosecha (Tucuch *et al.*, 2005). En marañón se recomiendan podas sanitarias y tratamiento preventivo con fungicidas a base de oxiclورو de cobre o azufre como ingrediente activo antes de iniciar la floración; durante la floración y formación del fruto se puede utilizar un fungicida sistémico a base de Fosetyl-al, Metalaxil-m o Triforine para reducir la incidencia de la necrosis en frutos (Canales, 2007).

In citrus, Varela *et al.* (2013) reported the application of benomyl and copper oxychloride-based compounds against *L. theobromae* in the various cultivation stages. Canales (1998) suggests in order to control the cancer of the trunk and branches of mango, to carry out a surgery in the cancer until eliminating the damaged tissue and then apply Benlate®, Tecto 60® or Derosal 50® in the wounds. Also with regard to dieback in mango, it is recommended to prune the wounds and spray with copper-based fungicides every 15-20 days. The products Captan, Maneb, Zineb and Benomyl may also be applied from the beginning of the flowering period up to a month before the harvest (Tucuch *et al.*, 2005). Sanitary pruning and preventive treatment with copper oxychloride or sulfur as an active ingredient is recommended on cashew before beginning the flowering period; during the flowering period and the formation of the fruit, a systemic fungicide with a Fosetyl-al, Metalaxil-m or Triforine base may be used to reduce the incidence of necrosis on the fruit (Canales, 2007).

## CONCLUSIONS

*Lasiodiplodia theobromae* is a pathogen with limited pathogenicity studies and a range of hosts in Mexico. The majority of the reports of *L. theobromae* have been based on morphological characteristics. The complex of cryptic species associated with *L. theobromae* require studies that associate morphological and molecular or genetic characteristics. The priorities of the investigation programs must focus on quantifying the impact that this fungus has on various crops, as well as determining the means of infection and the evaluation of susceptibility to chemical products in order to establish guidelines for an effective control strategy.



## CONCLUSIONES

*Lasiodiplodia theobromae* es un patógeno con escasos estudios de patogenicidad y rango de hospederos en México. La mayoría de los reportes de *L. theobromae* se han basado en características morfológicas. El complejo de especies crípticas asociadas a *L. theobromae* requiere de estudios que asocien características morfológicas y moleculares o genéticas. Las prioridades de los programas de investigación deberían enfocarse en cuantificar el impacto que ocasiona este hongo en diversos cultivos, así como determinar el modo de infección y la evaluación de susceptibilidad a productos químicos para establecer lineamientos de una estrategia efectiva de control.

### Agradecimientos

Al proyecto 211-163213 “El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador” financiado por SAGARPA-CONACYT y al CONACYT por el financiamiento a los estudios de P. A. Picos-Muñoz.

## LITERATURA CITADA

Abdollahzadeh J, Javadi A, Mohammadi-Goltapeh E, Zare R and Phillips AJL. 2010. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia* 25:1-10.

Al-Sadi AM, Al-Wehaibi AN, Al-Shariqi RM, Al-Hammadi MS, Al-Hosni I, Al-Mahmooli IH and Al-Ghaithi AG. 2013. Population genetic analysis reveals diversity in *Lasiodiplodia* species infecting date palm, citrus, and mango in Oman and the UAE. *Plant Disease* 97(10):1363-1369.

Alvarez, MG. 1976. Primer catálogo de enfermedades de plantas Mexicanas. *Fitofilo* 71: 169 p.

Alves A, Crous PW, Correia A and Phillips AJL. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28:1-13.

Alvidrez-Villarreal R, Hernández-Castillo FD, García-Martínez O, Mendoza-Villarreal R, Rodríguez-Herrera R y Aguilar CN. 2012. Isolation and pathogenicity of fungi associated to ambrosia borer (*Euplatypus segnis*) found injuring pecan (*Carya illinoensis*) wood. *Agricultural Sciences* 3:405-416.

Barbosa-Martínez C, León-García LP, Sepúlveda-Sánchez J and Nieto-Angel D. 2002. Effects of ozone, iodine and

### Acknowledgements

To project 211-163213 “El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador” financed by SAGARPA-CONACYT and to CONACYT for financing the studies of P.A. Picos-Muñoz.

~~~~~ Finaliza la versión en Inglés ~~~~~

chlorine on spore germination of fungi isolated from mango fruits. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20(1): 60-65.

Bautista-Baños S, Díaz-Pérez JC and Barrera-Necha L. 2002. Postharvest fungal rots of sapote mamey *Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. More & Stearn. *Postharvest Biology and Technology* 24:197-200.

Becerra L. 1995. Enfermedades del cultivo de mango. Pp:83-101. In: Mata B, Mosqueda V (eds.) *La producción de mango en México*. Editorial Limusa. México. 159 p.

Begoude BAD, Slippers B, Wingfield MJ and Roux J. 2010. Characterization of *Botryosphaeriaceae* and *Cryphonectriaceae* associated with *Terminalia* spp. in Africa, PhD thesis, University of Pretoria. 268 p

Burgess TI, Barber PA, Mohali S, Pegg G, de Beer W and Wingfield MJ. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* 98:423-435.

Canales CR. 1998. *Tecnología para la producción temprana de mango*. 1 ed. Comité Editorial del Campo Experimental Edzná. 12 p.

Canales CR. 2007. Control de la necrosis en frutos de marañón *Anacardium occidentale* en la península de Yucatán. Reporte anual de investigación e innovación tecnológica INIFAP. http://utep.inifap.gob.mx/tecnologias_agricolas.php (consulta, mayo 2014).

Cardoso J, Vidal J, dos Santos A, Freire F and Viana F. 2002. First report of branch dieback of cashew caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Brazil. *Plant Disease* 86(5):558.

Crous PW and Palm ME. 1999. Reassessment of the anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum*. *Sydowia* 52:167-175.

Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WFO, Phillips AJL, Alves A, Burgess TI, Barber PA and Groenewald JZ. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* 55:235-253.

Damm U, Crous PW and Fourie PH. 2007. Botryosphaeriaceae as potential pathogens of *Prunus* in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* 99:664-680.

Da Silva A, Brainer R, Michereff S, da Silva M and Saraiva M. 2012. Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. *European Journal of Plant Pathology* 132:489-498.

De los Santos de la RF, Becerra LEN, Mosqueda VR, Vásquez A y Vargas A. 2000. Manual de producción de papaya en el estado de Veracruz. Folleto Técnico No. 17. INIFAP-CIR-

- GOC. Campo Experimental Cotaxtla. Veracruz, México. 67 p.
- Denman S, Crous PW, Taylor J, Kang C, Pascoe I and Wingfield MJ. 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria* and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology* 45:125-140.
- Gómez-Jaimes R, Nieto-Ángel D, Téliz-Ortiz D, Mora-Aguilera JA, Martínez-Damián MT and Vargas-Hernández M. 2009. Evaluación de la calidad e incidencia de hongos en frutos refrigerados de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn. *Agrociencia* 43:37-48.
- Hawksworth D, Crous PW, Redhead S, Reynolds D, Samson R, Seifert K, Taylor J, Wingfield MJ, Abaci O, Aime C, Asan A, *et al.* 2011. The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. *IMA Fungus* 2:105-112.
- Hernández AM. 2010. Caracterización cualitativa de frutos de rambután (*Nephelium lappaceum* L.) almacenamiento postcosecha y patógenos asociados. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 50 p.
- Hernández FLM, Gómez JR y Andrés AJ. 2013. Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. Campo Experimental Santiago Ixcuintla, INIFAP. Libro Técnico No. 1. Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. 87 p.
- Ismail AM, Cirvilleri G, Polizzi G, Crous PW, Groenewald JZ and Lombard L. 2012. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australasian Plant Pathology* 41:649-660.
- Johnson GI, Mead AJ, Cooke AW and Dean JR. 1992. Mango stem end rot pathogens. Fruit infection by endophytic colonisation of the inflorescence and pedicel. *Annals of Applied Biology* 120:225-234.
- Khanzada MA, Lodhi AM and Shahzad S. 2005. Chemical control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of mango decline in Sindh. *Pakistan Journal of Botany* 37:1023-1030.
- Kirk P, Stalpers J, Braun U, Crous PW, Hansen K, Hawksworth D, Hyde K, Lucking R, Lumbsch T, Rosman A, Seifert K and Stadler M. 2013. A without-prejudice list of generic names of fungi for protection under the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants. *IMA Fungus* 4(2):381-443.
- Li HY, Cao RB and Mu YT. 1995. *In vitro* inhibition of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia theobromae*, and chemical control of gummosis disease of Japanese apricot and peach trees in Zhejiang Province, China. *Crop Protection* 14:187-191.
- Liu A, Chen W and Li X. 2005. Changes in the postharvest physiology and lychee fruits latently infected by anthracnose fungus and the biological characteristic of the pathogenic fungus of the disease. *Acta Horticulturae* 665:365-371.
- Liu J, Phookamsak R, Doilom M, Wikee S, Li Y, Ariyawansa H, Boonme S, Chomnunti P, Dai D, Bhat J, Romero AI, Zhuang W, Monkai J, Jones EBG, Chukeatirote E, Ko KTW, Zhao Y, Wang Y and Hyde KH. 2012. Towards a natural classification of Botryosphaeriales. *Fungal Diversity* 57:149-210.
- Lutchmeah RS. 1988. *Lasiodiplodia theobromae* causing fruit rot of *Annona muricata* in Mauritius. *Plant Pathology* 37:152.
- Marques MW, Lima NB, Morais Junior MA, Barbosa MAG, Souza BO, Michereff SJ, Phillips JL and Câmara MPS. 2013. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity* 61:181-193.
- Martínez SC. 2010. Etiología e incidencia de hongos asociados al manchado de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. Tesis de maestría. Colegio de postgraduados. Montecillo, Estado de México. 88 p.
- Maslen MM, Collis T and Stuart R. 1996. *Lasiodiplodia theobromae* isolated from subcutaneous abscess in a Cambodian immigrant to Australia. *Journal of Medical & Veterinary Mycology* 34:279-283.
- Mohali S, Burgess TI and Wingfield MJ. 2005. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology* 35:385-396.
- Mosqueda VR, De los Santos RF, Becerra LEN, Cabrera M, Ortega ZDA y del Angel PAL. 1996. Manual para cultivar mango en la planicie costera del Golfo de México. Campo Experimental Cotaxtla. INIFAP-CIRGOC. Folleto Técnico No. 15. Veracruz, México. 130 p.
- Netto MSB, Assuncao IP, Lima GSA, Marques MW, Lima WG, Monteiro JHA, de Queiroz BV, Michereff SJ, Phillips AJL and Camara MPS. 2014. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-014-0279-4> (Consulta, febrero 2014).
- Ochoa-Ascencio S, Vázquez M y Fariás R. 2007. Identificación genético molecular de hongos asociados a la pudrición peduncular del fruto de aguacate en Michoacán, México. *Memorias X Congreso Internacional/ XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*. Abs.
- Pavlic D, Slippers B, Coutinho TA, Gryzenhout M and Wingfield MJ. 2004. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. *Studies in Mycology* 50:313-322.
- Pavlic D, Slippers B, Coutinho TA and Wingfield MJ. 2009. Molecular and phenotypic characterization of three phylogenetic species discovered within the *Neofusicoccum parvum/N. ribis* complex. *Mycologia* 101:636-647.
- Pegg KG, Coates LM, Korsten L and Harding RM. 2003. Foliar, fruits and soilborne diseases. p. 299-337. *In* A. W. Whiley AW, Schaffer B and Wolstenholme BN (eds.). *The Avocado: Botany, Production, and Uses*. CABI Publishing, UK. 560 p
- Perera E, Lago E. 1986. Effect of the light period on mycelial growth and pycnidia formation of *Diplodia natalensis* (Abstr.). *Ciencias de la Agricultura* 26:14-18
- Phillips AJL, Alves A, Pennycook SR, Johnston PR, Ramaley A, Akulov A and Crous PW. 2008. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. *Persoonia* 21:29-55.
- Phillips AJL, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield MJ, Groenewald JZ and Crous PW. 2013. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76: 51-167.
- Pitt J and Hocking A. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3 ed. Springer. pp 125-127.
- Ploetz RC. 2003. *Diseases of Tropical Fruit Crops*. CABI Pu-

- blishing. Wallingford, UK. pp 76-77.
- Queiroz F, Muniz M and Menezes M. 1997. Podridão da haste do mamoeiro 'Sunrise Solo' causada por *Botryodiplodia theobromae* no Estado de Alagoas. *Summa Phytopathologica* 23(1):44-45.
- Rebell G and Forster RK. 1976. *Lasiodiplodia theobromae* as a cause keratomycoses. *Sabouraudia* 14:155-170.
- Rico AL. 2011. Próximos cambios en la nomenclatura de algas, hongos y plantas. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 46(3-4):381-385.
- Rojas BI. 2013. *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum capsici* asociadas a pudrición del pedúnculo y antracnosis en papaya (*Carica papaya* L.). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Culiacán, Culiacán, Sinaloa. 69 p.
- Romero CS. 1993. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo 333 p.
- Rubini MR, Silva-Ribeiro RT, Pomella AW, Maki CS, Araujo WL, dos Santos DR and Azevedo JL. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosus*, causal agent of witches' broom disease. *International Journal of Biological Sciences* 1:24-33.
- Saha A, Mandal P, Dasgupta S and Saha D. 2008. Influence of culture media and environmental factors of mycelial growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. *Journal of Environmental Biology* 29:407-410.
- Sakalidis ML, Ray JD, Lanoiselet V, Hardy GES and Burgess TI. 2011. Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley region of Western Australia. *European Journal of Plant Pathology* 130:379-391.
- Sandoval-Sánchez M, Nieto-Ángel D, Sandoval-Islas JS, Téliz-Ortiz D, Orozco-Santos M, y Silva-Rojas HV. 2013. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia* 47:61-73.
- Schoch CL, Shoemaker RA, Seifert KA, Hambleton S, Spatafora JW and Crous PW. 2006. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia* 98:1041-1052.
- Serrato-Díaz LM, Rivera-Vargas LI, Goenaga R and French-Monar RD. 2014. First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing inflorescence blight and fruit rot of longan (*Dimocarpus longan* L.) in Puerto Rico. *Plant Disease* 98:279.
- Shah MD, Verma KS, Singh K and Kaur R. 2010. Morphological, pathological and molecular variability in *Botryodiplodia theobromae* (Botryosphaeriaceae) isolates associated with die-back and bark canker of pear trees in Punjab, India. *Genetics and Molecular Research* 9 (2):1217-1228.
- Shahbaz M, Iqbal Z, Sallem A and Anjum MA. 2009. Association of *Lasiodiplodia theobromae* with different decline disorders in mango (*Mangifera indica* L.). *Pakistan Journal of Botany* 41:359-368.
- Sivakumar D, Wijeratnam RSW, Wijesundera RLC and Abeysekera M. 1997. Post-harvest diseases of rambutan (*Nephelium lappaceum*) in the western province. *Journal of the National Science Council of Sri Lanka* 25:225-229.
- Slippers B, Crous PW, Denman S, Coutinho TA, Wingfield BD and Wingfield MJ. 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96:83-101.
- Slippers B, Burgess T, Pavlic D, Ahumada R, Maleme H, Mohali S, Rodas C and Wingfield M. 2009. A diverse assemblage of Botryosphaeriaceae infect *Eucalyptus* in native and non-native environments. *Southern Forests* 71:101-110.
- Slippers B, Boissin E, Phillips AJL, Groenewald JZ, Lombard L, Wingfield MJ, Postma A, Burgess T and Crous PW. 2013. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriales*: a systematic and evolutionary framework. *Studies in Mycology* 76:31-49.
- Summerbell RC, Kraiden S, Levine R and Fuksa M. 2004. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Lasiodiplodia theobromae* and successfully treated surgically. *Medical Mycology* 42:543-547.
- Tamayo PJ. 2007. Enfermedades del aguacate. *Politécnica* 4:51-70.
- Tovar PJM, Mora AJA, Nava DC, Téliz OD, Villegas MÁ y Leyva MSG. 2013. Control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of dieback of sapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn] grafts in Mexico. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36: 233-238.
- Tucuch CFM, Palacios PA, Ku NR y Guzmán EC. 2005. Manejo del cultivo de mango en el estado de Campeche. *Campo Experimental Edzna, INIFAP. Folleto Técnico. Campeche, Camp., México.* 33-34p.
- Umezurike G. 1979. The cellulolytic enzymes of *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Biochemistry Journal* 177:9-19.
- Úrbez-Torres JR, Leavitt GM, Guerrero JC, Guevara J and Gubler WD. 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease* 92:519-529.
- van Niekerk JM, Crous PW, Groenewald JZ, Fourie PH and Halleen F. 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96:781-798.
- Varela FSE, Orozco SM, Torres ARI y Silva AGL. 2013. Guía técnica para la identificación y manejo de plagas y enfermedades en cítricos. Universidad Autónoma de Tamaulipas 428 p.
- Vásquez-López A, Mora-Aguilera JA, Cárdenas-Soriano E y Téliz-Ortiz D. 2009. Etiología e histopatología de la muerte descendente de árboles de mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore y Stearn] en el estado de Guerrero, México. *Agrociencia* 43:717-728.
- Ventura JA, Costa H and Tatagiba J. 2004. Papaya diseases and integrated control. p. 201-268. *In: Naqvi SAMH (ed.). Diseases of Fruits and Vegetables: Diagnosis and Management. Volume II. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, United States of America.* 704 p
- Wang F, Zhao L, Li G, Huang J and Hsiang T. 2011. Identification and characterization of *Botryosphaeria* spp. causing gummosis of peach trees in Hubei Province, Central China. *Plant Disease* 95:1378-1384.
- Wijayawardene N, Crous PW, Kirk P, Hawksworth D, Dai D, Boehm E, Boonmee S, Braun U, Chommunti P, D'Souza

- M, *et al.* 2014. Naming and outline of Dothideomycetes-2014. www.fungaltaxonomy.org/files/6813/9241/1345/Naming_and_Outline_of_Dothideomycetes_2014.pdf (consulta, mayo 2014)
- Woo PC, Lau SK, Ngan AH, Tse H, Tung ET and Yuen KY. 2008. *Lasiodiplodia theobromae* pneumonia in a liver transplant recipient. *Journal of Clinical Microbiology* 46 (1):380-384.
- Zhou S and Stanosz GR. 2001. Relationships among *Botryosphaeria* species and associated anamorphic fungi inferred from the analysis of ITS and 5.8S rDNA sequences. *Mycologia* 93:516-527.

Asociación de un *Potexvirus* como Agente Causal de Manchas Cloróticas en *Opuntia ficus-indica*

Association of a *Potexvirus* as a Causal Agent of Chlorotic Spots on *Opuntia ficus-indica*

Berenice Alonso Barrera, Gustavo Mora Aguilera, Guadalupe Valdovinos Ponce, Daniel Leobardo Ochoa Martínez, Esteban Rodríguez Leyva, Postgrado en Fitosanidad, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, km 36.5 Carretera México-Texcoco. Montecillo, Estado de México, C.P. 56230; Bertha Tlapal Bolaños, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Estado de México, C.P. 56230; Rodolfo De la Torre-Almaraz, FES-Iztacala-UNAM. Unidad de Biotecnología y Prototipos. Avenida De los Barrios 1, Los Reyes Iztacala. Tlalnepantla, Estado de México, C.P. 54090. Correspondencia: (ldaniel@colpos.mx).

Recibido: Julio 4, 2013 **Aceptado:** Octubre 15, 2014

Alonso Barrera B, Mora Aguilera G, Valdovinos Ponce G, Ochoa Martínez DL, Rodríguez Leyva E, Tlapal Bolaños B y De la Torre Almaraz R. 2015. Asociación de un Potexvirus como Agente Causal de Manchas Cloróticas en *Opuntia ficus-indica*. *Revista Mexicana de Fito-patología* 33: 75-86.

Resumen. El nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) se introdujo recientemente a Cuauhtepc de Hinojosa, Hidalgo. En esta región se detectó un virus ocasionando halos cloróticos y manchas irregulares en los cladodios. En infecciones severas los cladodios pierden turgencia en postcosecha, lo cual causa mermas comerciales significativas. El virus se transmitió mecánicamente en seis de 11 plantas indicadoras. En *Chenopodium quinoa* causó infección sistémica consistente en venas cloróticas y manchas amarillas intervenales. El virus se transmitió en 43 % de los cladodios inoculados induciendo halos cloróticos y manchas cloróticas irregulares a los 7 y 25 días después de la inoculación, respectivamente. El análisis electroforético mostró que el genoma del virus es de ARN de cadena sencilla, mientras que al microscopio electrónico de

Abstract. The cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) was recently introduced in Cuauhtepc de Hinojosa, Hidalgo. In this region, a virus was detected causing chlorotic halos and irregular spots on the cladodes. In severe infections, postharvest cladodes lose turgidity, which causes significant commercial losses. The virus was mechanically transmitted to six out of eleven indicator plants. In *Chenopodium quinoa*, it caused systemic infection showed as chlorotic veins and intervenal yellow spots. The virus was transmitted in 43 % of the inoculated cladodes, inducing chlorotic halos and irregular chlorotic spots at 7 and 25 days after inoculation, respectively. The electrophoretic analysis showed that the virus is an RNA single stranded genome, and flexible rod particles were observed using a transmission electron microscope. The RT-PCR diagnostic test indicated that the virus is a species of Potexvirus. In the cactus pear production units that were evaluated, the virus caused a 47-60 % and 51-79 % of incidence and severity, respectively, with an aggregated spatial pattern with strong row directionality, suggesting virus dispersion through pruning and harvesting.

transmisión se observaron partículas virales en forma de varilla flexible. El diagnóstico por RT-PCR indicó que el virus corresponde a una especie del género *Potexvirus*. En las unidades de producción evaluadas, el virus causó una incidencia del 47-60 % y severidad del 51-79 %, con distribución espacial en agregados y con fuerte direccionalidad en sentido de los surcos, debido posiblemente al manejo de poda y cosecha.

Palabras clave: nopal verdura, cactáceas, virus ARN, varilla flexible.

México cuenta con diferentes especies de cactáceas que tienen importancia alimenticia, ecológica y cultural. De las cactáceas comestibles destacan los nopales (*Opuntia* spp.) los cuales se producen como cladodios jóvenes para consumo humano, siendo *O. ficus-indica* (L.) Miller la especie más importante. Actualmente, México es el primer productor y consumidor de nopal verdura en el mundo. En el 2009, el país contaba con 13,123.91 ha (SIAP-SAGARPA, 2013), siendo la zona centro la principal región productora y consumidora. En Cuauhtémoc de Hinojosa, Hidalgo, en donde se cultivaba la variedad Atlixco-Puebla, se detectaron plantas con manchas anulares de color amarillo a blanquecino localizadas alrededor de las areolas. Cladodios con síntomas más severos presentaron coloración amarillenta generalizada, adelgazamiento y eventual marchitez. Los cladodios que se cortan para la venta se oscurecen progresivamente y en 24 h pueden mostrar una coloración cobriza que demerita su comercialización. En México, Venezuela y Estados Unidos de Norteamérica se reportan en algunas cactáceas al *Cactus virus X* (Lastra *et al.*, 1976), *Saguaro cactus virus* (Nelson y Tremaine, 1975), *Sammons' Opuntia virus* (Milbrath y Nelson, 1972), *Cactus virus 2* (Brandes and Wetter, 1959), *Zygocactus virus* (Fauquet *et al.*, 2005) y al

Key words: cactus pear, cacti, RNA virus, flexible rod.

Mexico has several different species of cacti that are of alimentary, ecological and cultural importance. Of those that are edible, the cactus pears (*Opuntia* spp.) are the most important. These species are produced as young cladodes for human consumption, being *O. ficus-indica* (L.) Miller the most important one. Currently, Mexico is the first producer and consumer of cactus pear in the world. In 2009, the country had 13,123.91 hectares (SIAP-SAGARPA, 2013), being the central zone the main region for production and consumption. In Cuauhtémoc de Hinojosa, Hidalgo, where the Atlixco-Puebla variety is cultivated, plants were detected with yellow to whitish ringspots around the areoles. Cladodes with more severe symptoms showed a generalized yellow color, thinning and eventual wilt. The cladodes that are harvested for sale become progressively dark and within 24 hours could show a copper-like color that reduced its commercialization. In Mexico, Venezuela and the United States of North America: *Cactus virus X* (Lastra *et al.*, 1976), *Saguaro cactus virus* (Nelson and Tremaine, 1975), *Sammons' Opuntia virus* (Milbrath and Nelson, 1972), *Cactus virus 2* (Brandes and Wetter, 1959), *Zygocactus virus* (Fauquet *et al.*, 2005), and *Tobacco mosaic virus* are reported in some cacti (Giri and Chessin, 1975). In Cuauhtémoc de Hinojosa, the symptoms on the cladodes of the cactus pear cause economic losses to the producer, which justifies the importance of generating knowledge regarding the etiology of this disease. According to this information, the objectives of this research were to determine the causal agent of the chlorotic spots on the cactus pear in Cuauhtémoc de Hinojosa, Hidalgo, and to estimate the incidence and severity in commercial plants in this region.

Tobacco mosaic virus (Giri y Chessin, 1975). En Cuauhtepac de Hinojosa, los síntomas que se manifiestan en los cladodios de nopal verdura ocasionan pérdidas económicas al productor, lo que justifica la importancia de generar conocimiento acerca de la etiología de esta enfermedad. Con base en lo anterior, los objetivos del presente trabajo fueron determinar el agente causal de las manchas cloróticas del nopal verdura en Cuauhtepac de Hinojosa, Hidalgo, y estimar la incidencia y severidad en plantaciones comerciales de esta localidad.

Se examinaron tres unidades de producción de nopal verdura de 102 x 46 m cada una, ubicadas en Puerta de Yolo en Cuauhtepac de Hinojosa, Hidalgo. Las plantas estaban sembradas en surcos a 35 cm entre plantas y a 60 cm entre hileras, y se fertilizaron con estiércol vacuno. El productor incluyó podas intensas en el manejo de plantación y cosecha. En otoño 2009, se recolectaron 50 cladodios jóvenes de 50 plantas de nopal localizadas en estas unidades; 25 tenían halos cloróticos alrededor de las areolas (Figura 1A) y el resto fueron asintomáticos. Las muestras se trasladaron al invernadero y laboratorio de Virus Fitopatógenos del Colegio de Postgraduados. Para descartar la presencia de hongos y bacterias fitopatógenas, los cladodios sintomáticos se observaron directamente en un microscopio estereoscópico y se disectaron en fragmentos de 1 cm² que se sembraron en PDA y B de King. Para cada medio se sembraron 40 fragmentos de cladodio distribuidos en cuatro cajas Petri. Este análisis se repitió dos veces, y al obtener resultados negativos para estos microorganismos se hizo la extracción de ARN bicatenario (ARNbc) para determinar la presencia de un posible virus. La extracción se hizo independientemente a partir del tejido epidérmico de cuatro cladodios sintomáticos y de cuatro asintomáticos (testigo), siguiendo el protocolo de Dodds *et al.*, (1987).

La purificación parcial del posible virus se hizo de acuerdo con el protocolo propuesto por Lastra

Three units for the production of cactus pear were examined, each 102 x 46 m, located in Puerta de Yolo in Cuauhtepac de Hinojosa, Hidalgo. The plants were sown in furrows with 35 cm between plants and 60 cm between rows, and were fertilized with cattle manure. The producer included intensive pruning as part of the management of the plantation and harvest. In fall of 2009, 50 young cladodes were collected from 50 cactus plants located in these units; 25 had chlorotic spots around the areoles (Figure 1A) and the rest were asymptomatic. The samples were transported to the greenhouse and to the laboratory of Plant pathogenic virus at the Postgraduate College. In order to discard the presence of fungi and phytopathogenic bacteria, the symptomatic cladodes were directly observed through a stereo microscope and were dissected in 1 cm² fragments that were spread on PDA and King B media. For each medium, 40 fragments of cladodes were placed and, distributed on four Petri dishes. This analysis was repeated twice, and due to they were obtained negative results for these microorganisms, the double-stranded RNA (dsRNA) was extracted in order to determine the presence of a possible virus. The extraction was done independently from the epidermal tissue of four symptomatic and four asymptomatic (control), following the protocol of Dodds *et al.*, (1987).

The partial purification of the possible virus was performed in according to the protocol proposed by Lastra *et al.*, (1976). Furthermore, the partial purification of the virus and the maceration of the epidermis that covered the chlorotic spots of the sick cladodes were independently placed on formvar coated copper 400 mesh grids. They were contrasted with 2 % uranyl acetate and observed under a JEOL transmission electron microscope, models JEM-1200 EXII and JEM-100 CX II of the Central de Instrumentación de Microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN and the Facultad de Estudios Superiores Unidad Iztacala de la UNAM, respectively.

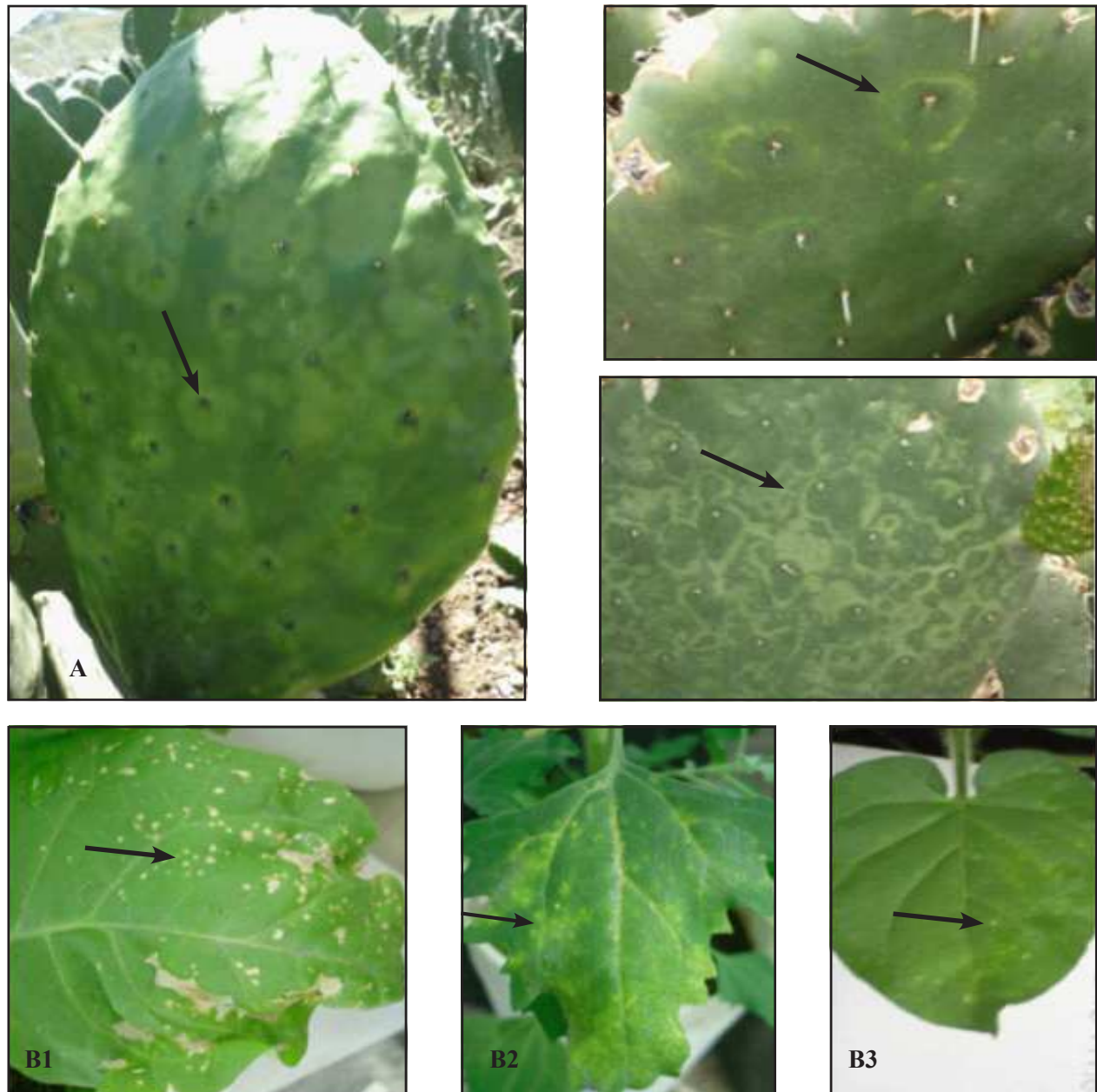


Figura 1. Cladodios de nopal verdura en campo con manchas anulares cloróticas alrededor de las areolas o entre ellas (A). Síntomas en plantas indicadoras inoculadas con la savia de cladodios de nopal verdura con manchas anulares cloróticas (B). Lesiones locales necróticas en *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi* (B1). Lesiones locales cloróticas en *Chenopodium quinoa* (B2). Lesiones locales cloróticas en *N. benthamiana* (B3).

Figure 1. Cladodes of cactus pear in the field with chlorotic ringspots around the areoles or between them (A). Symptoms on indicator plants inoculated with sap of cladodes of cactus pear with chlorotic ringspots (B). Necrotic local injuries on *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi* (B1). Chlorotic local injuries on *Chenopodium quinoa* (B2). Chlorotic local injuries on *N. benthamiana* (B3).

et al., (1976). Además, el purificado parcial y el macerado de la epidermis que cubría los halos cloróticos de cladodios enfermos se colocaron independientemente en rejillas de cobre de malla 400 con formvar, se contrastaron con acetato de uranilo al 2 % y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL modelos JEM-1200 EXII y JEM-100 CX II de la Central de Instrumentación de Microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN y de la Facultad de Estudios Superiores Unidad Iztacala de la UNAM, respectivamente.

La transmisión del posible virus se hizo mediante inoculación mecánica en tres grupos de 11 plantas indicadoras cada uno (*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *Capsicum annuum*, *Chenopodium quinoa*, *Ch. amaranticolor*, *Datura stramonium* y *Solanum lycopersicum*). Como fuente de inóculo se utilizó la epidermis de cladodios sintomáticos recolectados en Cuauhtepc de Hinojosa. Las plantas se mantuvieron en invernadero a 25-30 °C con humedad relativa del 70±5 % y 12 horas-luz, y se revisaron durante 15 días para registrar la aparición de síntomas. La transmisión mecánica a plantas de nopal se hizo también mecánicamente en siete cladodios asintomáticos de plantas diferentes. Como fuente de inóculo se utilizó la epidermis de cladodios sintomáticos, la cual se maceró en amortiguador de fosfatos + DIECA 0.01M pH 7.2. Se espolvoreó carborundum de 600 mallas sobre una superficie aproximada de 5 cm² en la porción superior del cladodio, y con un hisopo se tomó el inóculo y se frotó sobre dicha superficie. Como testigo negativo se inocularon siete plantas asintomáticas con un hisopo humedecido en el amortiguador antes indicado. Todas las plantas se mantuvieron en invernadero durante 45 días y se observaron cada 72 h para registrar la aparición de síntomas. Las plantas utilizadas en esta fase se obtuvieron en

The transmission of the possible virus was performed through mechanical inoculation on three groups of eleven indicator plants (*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *Capsicum annuum*, *Chenopodium quinoa*, *Ch. amaranticolor*, *Datura stramonium* y *Solanum lycopersicum*). The epidermis of symptomatic cladodes collected in Cuauhtepc de Hinojosa was used as a source of inoculum. The plants were kept in greenhouse at 25-30 °C with relative humidity of 70 ± 5 % and 12 daylight-hours; they were examined during 15 days in order to record the appearance of symptoms. Mechanical transmission to cactus plants was also done mechanically on seven asymptomatic cladodes of different plants. The epidermis of symptomatic cladodes was used as a source of inoculum, which was macerated in phosphate buffer + DIECA 0.01M pH 7.2. 600 mesh carborundum was sprinkled over a surface of approximately 5 cm² on the upper portion of the cladode; the inoculum was taken with a cotton swab and was rubbed over the surface. As a negative control, seven asymptomatic plants were inoculated with a cotton swab previously moistened with the buffer mentioned above. All the plants were kept in greenhouse for 45 days and were observed every 72 hours in order to record the appearance of symptoms. The plants used in this phase were obtained from Tlalnepantla, Morelos; a region where no viral symptoms have been observed, in order to have natural growth conditions.

The extraction of RNA was done with the epidermis of symptomatic and asymptomatic cladodes with the commercial product Trizol[®] following the manufacturer's instructions, and with the silica method. The RT-PCR was done with primers for *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Carnation mottle virus* (CarMV) and for the Potexvirus and Tobamovirus genera. For TMV, the RT-PCR was

Tlalnepantla, Morelos, región en donde no se han observado síntomas virales, a fin de tener condiciones naturales de crecimiento.

La extracción de ARN se hizo de la epidermis de cladodios sintomáticos y asintomáticos con el producto comercial Trizol[®] siguiendo las instrucciones del fabricante, y con el método de sílica. La RT-PCR se hizo con iniciadores para el *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Carnation mottle virus* (CarMV) y para los géneros *Potexvirus* y *Tobamovirus*. Para el TMV la RT-PCR se realizó en un solo paso con los iniciadores específicos TMVCPF y TMVCPR (Ortega *et al.*, 2007) que amplifican un fragmento de 240 pb. El fragmento de la cubierta proteica del CarMV (1.05 kb) se amplificó con los iniciadores CarMV y CarMV/F (Singh *et al.*, 2005). Para el género *Potexvirus* (Van der Vlugt *et al.*, 2000) se utilizaron los iniciadores POTEX1RC, POTEX2RC y POTEX5RC. Las combinaciones POTEX1RC / POTEX5RC y POTEX2RC / POTEX5RC amplifican un fragmento de 735 y 584 pb, respectivamente, correspondientes a la replicasa viral. Para algún miembro del género *Tobamovirus* se utilizaron los iniciadores TMV5vAccl / TMV3vc y TMVcp5 / TMVcp3, que amplifican un fragmento de 360-419, y 300 pb, respectivamente. Para cada par de iniciadores se realizó la RT-PCR en un solo paso.

Para evaluar la distribución de la incidencia de síntomas en las unidades de producción, se determinó el número de plantas con manchas cloróticas irregulares o circulares, y la presencia de anillos cloróticos alrededor de las areolas. La primera unidad se dividió en tres secciones de cinco surcos cada una (localizadas a la entrada, parte media y final del invernadero, respectivamente) para evaluar 50 plantas/surco/sección (250 plantas en total). En cada una de las otras dos unidades se evaluaron 20 plantas continuas en cinco surcos (100 plantas en total). La severidad de la enfermedad se estimó cuantificando el número de cladodios sintomáticos

done in a single step with the specific primers TMVCPF and TMVCPR (Ortega *et al.*, 2007) that amplify a fragment of 240 pb. The fragment of the protein cover of the CarMV (1.05 kb) was amplified with the CarMV and CarMV/F (Singh *et al.*, 2005). For the *Potexvirus* genus (Van der Vlugt *et al.*, 2000) used the POTEX1RC, POTEX2RC. The PTEX1RC / POTEX5RC and POTEX2RC / pairs POTEX5RC amplify a fragment of 735 and 584 pb, respectively, corresponding to the viral replicase. For any member of the *Tobamovirus* genus, the primers used were TMV5vAccl / TMV3vc and TMVcp5 / primers TMVcp3, which amplify a fragment of 360-419, and 300 pb, respectively. For each pair of primers, the RT-PCR was done in a single step.

In order to evaluate the distribution of the incidence of symptoms in the production units, the number of plants with irregular or circular chlorotic spots and the presence of chlorotic rings around the areoles were determined. The first unit was divided in three sections of five furrows each (located at the entrance, middle and end of the greenhouse, respectively) in order to evaluate 50 plants/furrow/section (250 plants total). In each of the other two units, 20 continuous plants were evaluated in five furrows (100 plants total). The severity of the disease was estimated quantifying the number of symptomatic cladodes with regard to the number of total cladodes per plant, considering that the induced damages are of a systemic type, and under the supposition that greater number of infected cladodes implied a greater period of infection. The data obtained was analyzed the using Surfer[®] program ver. 8.0 in order to generate dispersion maps of severity with geostatistic interpolation.

The cladodes of cactus pear with symptoms associated to virus showed ringspots around and between the areoles (Figure 1A), and 48 hours after having been collected they turned aqueous

con respecto al número de cladodios totales por planta, considerando que los daños inducidos son de tipo sistémico, y bajo el supuesto de que mayor número de cladodios enfermos implicó mayor periodo de infección. Los datos obtenidos se analizaron con Surfer® ver. 8.0 para generar mapas de dispersión de severidad por interpolación geoestadística.

Los cladodios de nopal verdura con síntomas asociados a virus presentaron manchas anulares alrededor y entre las areolas (Figura 1A), y a 48 horas después de haberlos recolectado se tornaron acuosos y de color marrón. El análisis fitosanitario general de los cladodios sintomáticos no mostró signos de bacterias ni hongos fitopatógenos, pero se aisló ARN bicatenario, lo que indicó la presencia de un virus con ARN genómico. En algunos miembros de la familia Cactaceae están reportados el *Cactus virus X*, *Zygocactus virus*, *Cactus virus 2*, *Saguaro cactus virus*, *Sammon's Opuntia virus* y el *Tobacco mosaic virus*, cuyo genoma es también de ARN. Sin embargo, todos estos virus se descartan como posibles inductores de los síntomas observados debido a que los síntomas que se expresaron en el rango de plantas hospedantes (Cuadro 1), y la forma y tamaño de las partículas virales (Figura 2, Cuadro 2) no concuerdan con lo que hasta ahora está reportado en la literatura (De la Torre *et al.*, 2007; Hausbeck y Gildow, 1991; Lastra *et al.*, 1976; Nelson y Tremaine 1975).

En la epidermis de cladodios sintomáticos se observaron partículas virales en forma de varilla flexible, y en el purificado parcial varillas fragmentadas de tipo rígido (Figura 2A). Estas partículas tuvieron un tamaño promedio de 112 x 24 nm, el cual difiere de lo reportado por Fauquet *et al.* (2005) y De la Torre *et al.* (2007) (Cuadro 2), por lo que se descartó que las fracciones rígidas en nopal verdura correspondieran a alguna especie de *Tobamovirus*, género que se encontró en nopal tunero (De la Torre *et al.*, 2007). Las varillas flexibles en los cladodios

and brown. The general phytosanitary analysis of the symptomatic cladodes did not show signs of phytopathogenic fungi or bacteria; however, the double-stranded RNA was isolated, which indicated the presence of a virus with genomic RNA. In some members of the Cactaceae family the: *Cactus virus X*, *Zygocactus virus*, *Cactus virus 2*, *Saguaro cactus virus*, *Sammon's Opuntia virus* and *Tobacco mosaic virus*, whose genome is also RNA. However, all of these viruses have been reported discarded as possible causes for the observed symptoms due to the fact that the symptoms showed in the range of the host plants (Table 1), and the form and size of the viral particles (Figure 2, Table 2) do not coincide with what has been reported so far (De la Torre *et al.*, 2007; Hausbeck and Gildow, 1991; Lastra *et al.*, 1976; Nelson and Tremaine, 1975).

In the epidermis of symptomatic cladodes, viral particles were observed in a flexible rod form, and in the partial purification they look like fragmented rods of a rigid type (Figure 2A). These particles had an average size of 112 x 24 nm, which differ from what was reported by Fauquet *et al.* (2005) and De la Torre *et al.* (2007) (Table 2), therefore it was discarded that the rigid fractions in the cactus pear corresponded to any species of *Tobamovirus*, genus that was found in prickly pear cacti (De la Torre *et al.*, 2007). The flexible rods in the cladodes of did not correspond to those of the *Cactus virus X*, *Zygocactus virus* (*Alphaflexiviridae* family) nor to *Cactus virus 2* (*Betaflexiviridae* family), given that their size is greater than that of the observed particles.

The mechanical transmission of the causal agent occurred in three out of seven inoculated cladodes. No control cladode showed symptoms. Seven days after inoculation (dai), the first symptoms appeared on all the shoots emerged from the inoculated cladodes. The symptoms were chlorotic rings and spots found mainly on the mid-part of the shoots (Figure 2D). At 14 dai, the chlorosis was more

de nopal no correspondieron a las del *Cactus virus X*, *Zygocactus virus* (familia *Alphaflexiviridae*) ni al *Cactus virus 2* (Familia *Betaflexiviridae*), ya que su tamaño es mayor al de las partículas observadas.

La transmisión mecánica del agente causal ocurrió en tres de los siete cladodios inoculados. Ningún cladodio testigo mostró síntomas. A los siete días después de la inoculación (ddi), se presentaron los primeros síntomas en todos los brotes emitidos de los cladodios inoculados. Los síntomas fueron anillos y halos cloróticos localizados principalmente en la parte media de los brotes (Figura 2D). A los 14 ddi, la clorosis fue más evidente e incrementaron el número y tamaño de halos cloróticos (1-1.5cm), principalmente rodeando las areolas (Figura 2D). A los 25 ddi, los halos se convirtieron en manchas cloróticas circulares (1.5-2cm) e irregulares debido a su coalescencia (Figura 2D). Estos síntomas contrastan con los reportados por De la Torre *et al.* (2007), quienes observaron manchas cloróticas de 0.5-1cm distribuidas uniformemente fuera de la zona areolar en los cladodios de nopal tunero (*O. amyclaea*). De los virus reportados en cactáceas, únicamente en la asociación *Cactus virus X* – *Nopalea cochenillifera* (Lastra *et al.*, 1976), se presentan síntomas similares a los observados en el presente trabajo. En cactáceas silvestres este virus induce manchas anulares amarillas simples o concéntricas de 2-4 cm entorno a las areolas. Con base en la identificación por RT-PCR, los cladodios sintomáticos estuvieron infectados con alguna especie del género *Potexvirus* (Figura 2D). Este resultado es congruente con el análisis en microscopía electrónica de transmisión, en donde se observaron partículas virales flexibles, por lo que los síntomas asociados a cladodios de nopal verdura podrían corresponder a alguna especie del género *Potexvirus*, a excepción del *Cactus virus X* y *Zygocactus virus*, cuyas partículas son más grandes que las del virus aislado de los cladodios de nopal verdura; además,

evident and the number and size of the chlorotic spots increased, mainly circling the areoles (Figure 2D). At 25 dai, the rings became chlorotic spots, circular and irregular due to their coalescence (Figure 2D). These symptoms contrast with those reported by De la Torre *et al.* (2007), who observed chlorotic spots of 0.5-1cm uniformly distributed outside the areolar zone on the cladodes of the prickly pear cacti (*O. amyclaea*). Of the viruses reported in cacti, only in the *Cactus virus X* – *Nopalea cochenillifera* interaction (Lastra *et al.*, 1976), the symptoms showed are similar to those observed in this work. In wild cacti, this virus induces simple or concentric yellowish ringspots of 2-4 cm surrounding the areoles. According to identification by RT-PCR, the symptomatic cladodes were infected with a species of the genus *Potexvirus* (Figure 2D). This result is congruent with the transmission electron microscopy analysis, where flexible viral particles were observed, so the symptoms associated to cladodes of cactus pear could correspond to some specie of the genus

Cuadro 1. Síntomas en plantas indicadoras inoculadas con el virus aislado de cladodios de nopal verdura con manchas anulares cloróticas. Cuauhtepc de Hinojosa, Hidalgo.

Table 1. Symptoms on indicator plants inoculated with the virus isolated from cladodes of cactus pear with chlorotic ringspots. Cuauhtepc de Hinojosa, Hidalgo.

| Hospedante | Síntomas |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| <i>Capsicum annuum</i> var. Ancho | Asintomática |
| <i>Chenopodium amaranticolor</i> | Lesiones locales cloróticas |
| <i>C. quinoa</i> | Lesiones locales cloróticas |
| <i>Datura stramonium</i> | Lesiones locales cloróticas |
| <i>Nicotiana benthamiana</i> | Lesión sistémica |
| <i>N. clevelandii</i> | Asintomática |
| <i>N. glutinosa</i> | Lesiones locales cloróticas |
| <i>N. occidentalis</i> | Asintomática |
| <i>N. rustica</i> | Asintomática |
| <i>N. tabacum</i> var. Xanthi | Lesiones locales cloróticas |
| <i>Solanum lycopersicum</i> | Asintomática |

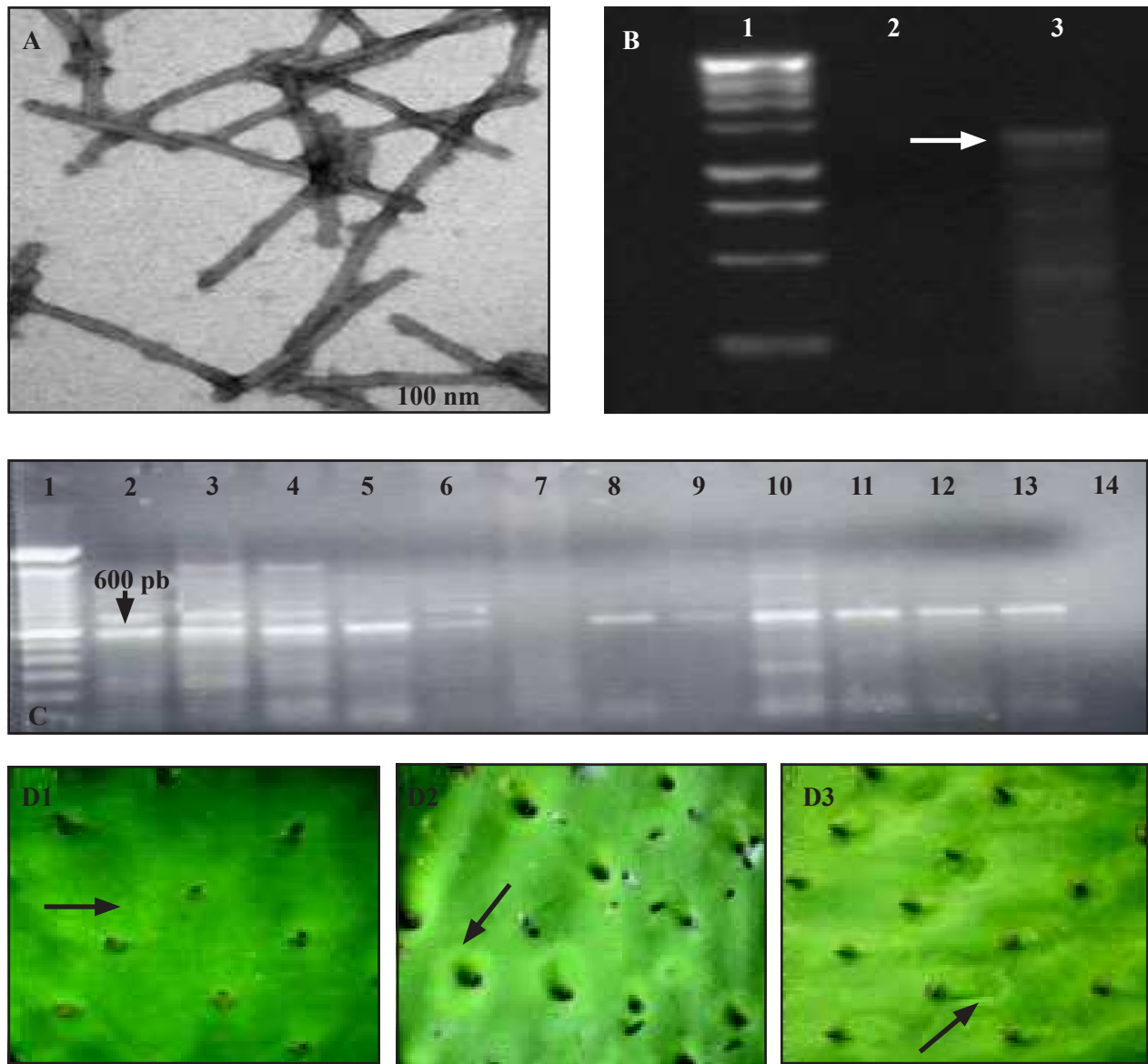


Figura 2. Partículas virales presentes en el purificado parcial obtenido de cladodios de nopal verdura con síntomas putativos a virus (A). Bandas de RNA bicatenario obtenidas a partir de plantas de nopal verdura (B). Carril 1: marcador molecular de 1Kb; carril 2: cladodios asintomáticos; carril 3: cladodios con manchas anulares cloróticas alrededor de las areolas. Productos de amplificación de RT-PCR para el género *Potexvirus* (C). Carril 1: marcador molecular de 1 Kb (Plus Invitrogen); carriles 2-6 y 8-12: cladodios de nopal verdura con manchas anulares cloróticas; carril 13: tejido foliar de orquídea infectada con un *Potexvirus*; carril 14: testigo negativo; carril 7: sin muestra. Manchas anulares cloróticas en brotes de cladodios inoculados con savia infectiva a los 7 (D1), 14 (D2) y 25 (D3) días después de la inoculación.

Figure 2. Viral particulates found in the partial purification obtained from cladodes of cactus pear with putative virus symptoms (A). Bands of double-stranded RNA obtained from the cactus pear (B). Line 1: molecular marker of 1Kb; line 2: asymptomatic cladodes; line 3: cladodes with chlorotic ringspots around the areoles. Products of RT-PCR amplification for the genus *Potexvirus* (C). Line 1: molecular marker 1 Kb (Plus Invitrogen); line 2-6 and 8-12: cladodes of cactus pear with chlorotic ringspots; line 13: foliar tissue of orchid infected with *Potexvirus*; line 14: negative control; line 7: without sample. Chlorotic ringspots in growths of cladodes inoculated with infected sap at 7 (D1), 14 (D2) and 25 (D3) days after inoculation.

Cuadro 2. Tipo y tamaño de partícula viral en el purificado parcial obtenido de cladodios de nopal verdura con manchas anulares cloróticas. Cuauhtepic de Hinojosa, Hidalgo.

Table 2. Type and size of a viral particle in a partial purified obtained from cactus pear cladodes with chlorotic ringspots. Cuauhtepic de Hinojosa, Hidalgo.

| Virus | Tipo de partícula | Tamaño nm | Referencias |
|------------------------|-------------------|----------------------|--|
| Potexvirus | Varilla flexible | | En esta investigación |
| Potexvirus | Varilla rígida | 112 x 24 | En esta investigación |
| Sammon's Opuntia Virus | Varilla rígida | | |
| Saguaro virus | | | |
| Zygocactus virus | Varilla flexible | | |
| Cactus virus X | | | |
| Cactus virus 2 | | | |
| TSWV | | | |
| TMV | | | |
| Tobamovirus | Varilla rígida | 325 x ¿?
317 x 18 | De la Torre <i>et al.</i> , 2007
Fauquet <i>et al.</i> , 2005 |

los síntomas inducidos por *Zygocactus virus* en *C. quinoa* son distintos a los encontrados en el presente trabajo.

La incidencia de plantas enfermas y la severidad promedio fue de 47-60 y 51-79 %, respectivamente, lo que sugiere una infección crónica y la transmisibilidad vegetativa del agente causal. En Taiwán, el *Cactus virus X* causó en pithaya (*Hylocereus undatus*) una incidencia de 90, 50 y 60-70 % en Pingtung, Kinman y en otras áreas, respectivamente (Liao *et al.*, 2003). El patrón de distribución espacial de plantas enfermas fue agregado con direccionalidad de los surcos (Figura 3). Los agregados fueron de 2-5 plantas implicando posible diseminación por medio de poda y cosecha, las cuales se realizan con cuchillo sin desinfectar. Esta posibilidad se reafirma con resultados de la transmisión mecánica (43 %), por lo que el manejo de este virus debe ser preventivo mediante uso de material propagativo sano y con desinfección de herramientas. Debido a que el altiplano mexicano es la principal región productora de nopal verdura, es necesario determinar la especie encontrada del género Potexvirus y conducir estudios epidemiológicos y de manejo.

Potexvirus, except *Cactus virus X* and *Zygocactus*, whose particles are larger than those isolated from the cactus cladodes; furthermore, the induced symptoms by *Zygocactus virus* on *C. quinoa* are different to those found in this work.

The incidence of diseased plants and the average severity was of 47-60 and 51-79 %, respectively, which suggest a chronic infection and the vegetative transmission of the causal agent. In Taiwan, the *Cactus virus X* caused on the pithaya (*Hylocereus undatus*) an incidence of 90, 50 and 60-70% in Pingtung, Kinman and in other areas, respectively (Liao *et al.*, 2003). The spatial distribution pattern of diseased plants was added with directionality of the furrows (Figure 3). The aggregates were 2-5 plants implicating possible dissemination by means of pruning and harvest tools, which are carried out using a non-desinfested knife. This possibility agrees with the results of the mechanical transmission (43%), therefore the management of this virus must be preventive through the use of healthy material and desinfested tools. Due to the Mexican plateau is the most important cactus pear production region, it is necessary to determine the species of the Potexvirus that was found and

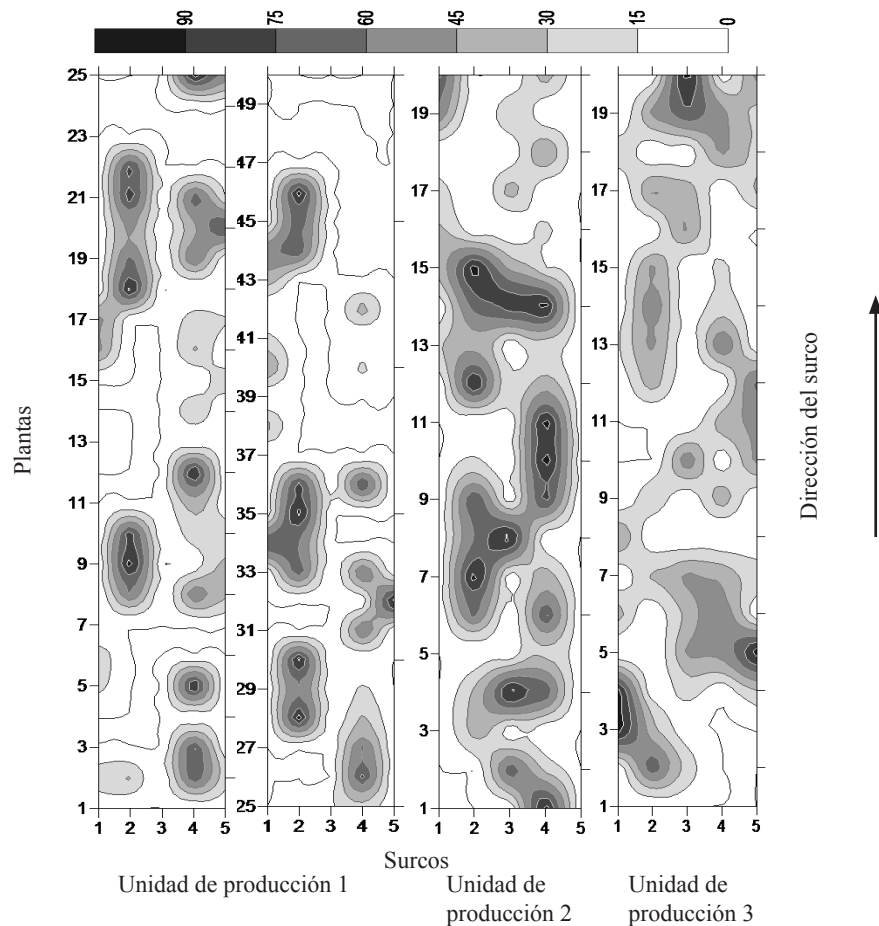


Figura 3. Mapa de distribución espacial de la severidad de la enfermedad asociada a manchas cloróticas en nopal verdura en Cuauhtepc de Hinojosa, Hidalgo.

Figure 3. Spatial distribution map of the severity of the disease associated with chlorotic spots on cactus pear in Cuauhtepc de Hinojosa, Hidalgo.

CONCLUSIONES

En este trabajo se reporta un nuevo virus afectando a la familia Cactaceae en México. Los síntomas de halos y manchas cloróticas irregulares y circulares presentes en *O. ficus-indica* se relacionaron con un virus de ARN de cadena sencilla con partícula de tipo varilla flexible. Con base en la RT-PCR, se confirmó que el virus pertenece al género *Potexvirus*. La incidencia de la enfermedad fue del 47-60 %, con distribución agregada y fuerte tendencia en dirección de surcos posiblemente por efecto del manejo y cosecha.

to carry out epidemiological and management studies. Given that the Mexican plateau is the main region that produces cactus pear, it is necessary to determine the species found in the genus *Potexvirus* and carry out epidemiological and management studies.

CONCLUSIONS

In this work, a new virus is reported affecting the Cactaceae family in Mexico. The irregular

Agradecimientos

A la M.C. Ma. Esther Sánchez Espíndola, de la Central de Instrumentación de Microscopía de la ENCB-IPN, por su apoyo en la observación y fotografías al microscopio electrónico de transmisión (MET). Al técnico Jesús Espinoza de la FES-Iztacala UNAM, por las fotografías en el MET. Al Sr. Fermín Cerón Téllez, por permitir hacer este estudio en las unidades productivas de nopal verdura. Al CONACyT, por proporcionar la beca de postgrado.

LITERATURA CITADA

- Brandes J, Wetter C. 1959. Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. *Virology* 8: 99.
- De la Torre AR, Salazar SM y Ruiz MR. 2007. Ocurrencia de un Tobamovirus asociado con manchas anulares amarillas en nopal tunero en México. *Agrociencia* 41:763-773.
- Dodds J, Morris T and Jordan R. 1987. Plant viral double stranded RNA. *Annual Review of Phytopathology* 22:151-168.
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U and Ball LA. 2005. Virus taxonomy Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus. Academic Press, San Diego, CA. 1259 p.
- Giri L and Chessin M. 1975. A severe strain of *Tobacco mosaic virus* from cactus. *Phytopathology* 65: 824-825.
- Hausbeck MK and Gildow FE. 1991. First report of *Tomato spotted wilt virus* on thanksgiving cactus. *Plant Disease* 75: 215.
- Lastra JR, Gaskin D. and Uzcategui RC. 1976. Virus X del cactus en Venezuela. *Agronomía Tropical* 26: 303-310.
- Liao JY, Chang CA, Yan CR, Chen YC, and Deng TC. 2003. Detection and incidence of *Cactus virus X* on pitaya in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin* 12: 225-234.
- Milbrath MG and Nelson MR. 1972. Isolation and characterization of a virus from saguaro cactus. *Phytopathology* 62:739-742.
- Nelson MR and Tremaine JH. 1975. Physicochemical and serological properties of virus from saguaro cactus. *Virology* 65: 309-319.
- Ortega E, Zambrano K, Carballo O, Romano M. and Edgloris M. 2007. Caracterización de un Tobamovirus aislado de plantas de Canavalia (*Canavalia ensiformis* L.) Aragua, Venezuela. *INCI*. 32:202-205.

and circular chlorotic rings and spots symptoms found on *O. ficus-indica* were related to a virus of a simple RNA chain with particles of a flexible rod type. Based on the RT-PCR results, it was confirmed that the virus belongs to the *Potexvirus* genus. The incidence of the disease was of 47-60%, with aggregated distribution and a strong tendency to row direction possibly due to management and harvest effects.

Acknowledgements

To M.C. Ma. Esther Sánchez Espíndola, of the Central de Instrumentación de Microscopía de la ENCB-IPN, for her aid in the observation and photographs using the transmission electron microscope (TEM). To the technician Jesús Espinoza of the FES-Iztacala UNAM, for the photographs in the TEM. To Fermín Cerón Téllez, for allowing this study in the production units of cactus pear. To the CONACYT for providing the postgraduate grant.

~~~~~ Finaliza la versión en Inglés ~~~~~

- SIAP-SAGARPA. 2013. Anuario estadístico de la producción agrícola. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. [www.siap.gob.mx/index](http://www.siap.gob.mx/index) (consulta, junio del 2015).
- Singh HP, Hallan V, Raikhy G, Kulshrestha S, Sharma ML, Ram R, Garg ID and Zaidi AA. 2005. Characterization of an Indian isolate of *Carnation mottle virus* infecting carnations. *Current Science* 88: 25.
- Van Der Vlugt RAA, Stijger CM, Verhoeven JThJ and Lese-mann DE. 2000. First report of *Pepino mosaic virus* on tomato. *Plant Disease* 84: 103.

# Actividad antibacteriana de extractos metanol:cloroformo de hongos fitopatógenos

## Antibacterial activity of methanol:chloroform extracts of phytopathogenic fungi

**María de la Soledad Lagunes-Castro**, Doctorado en Ciencias Biomédicas; Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México; **Aracely López-Monteon, Angel Ramos-Ligonio**, LADISER Inmunología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Orizaba, Veracruz, México y Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México; **Ángel Trigos**, Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa, Universidad Veracruzana. Calle Médicos 5, Unidad del Bosque, Xalapa 91010, Veracruz, México y Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México; **Alejandro Salinas, César Espinoza**, Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa, Universidad Veracruzana. Calle Médicos 5, Unidad del Bosque, Xalapa 91010, Veracruz, México. Correspondencia: [cespinoza@uv.mx](mailto:cespinoza@uv.mx)

**Recibido:** Junio 13, 2014

**Aceptado:** Diciembre 1, 2014

Lagunes Castro MS, López Monteon A, Ramos Ligonio A, Trigos A, Salinas A y Espinoza C. 2015. Actividad antibacteriana de extractos metanol:cloroformo de hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 87-94.

**Resumen.** Se evaluó la actividad antibacteriana de 15 extractos metanol:cloroformo de hongos fitopatógenos contra las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -hemolítico, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermis coagulasa* (+), *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Dicha actividad se determinó por la técnica de difusión en disco, con una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL. Después de 24 h de incubación, los extractos de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum musae* mostraron halos de inhibición específicos para *Escherichia coli* (70  $\mu$ g/mL;  $17.6 \pm 0.20$  y  $15.6 \pm 0.26$ , respectivamente,  $P < 0.0001$ ) y el extracto de *Idriella lunata* mostró inhibición sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -hemolítico y *Pseudomonas aeruginosa*

**Abstract.** Antibacterial activity of methanol:chloroform extracts from fifteen phytopathogenic fungi strains was evaluated against bacterial strains of *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -hemolytic, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermis coagulase* (+), *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The antibacterial activity was determined by the disk diffusion method, with  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL of bacterial concentration. After 24 h of incubation, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum musae* extracts showed specific inhibition halos for *Escherichia coli* (70  $\mu$ g/mL;  $17.6 \pm 0.20$  and  $15.6 \pm 0.26$  respectively,  $P < 0.0001$ ) and the extract of *Idriella lunata* showed inhibition on the growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -hemolytic and *Pseudomonas aeruginosa* (70  $\mu$ g/mL;  $9.8 \pm 0.15$ ,  $9.2 \pm 0.15$  and  $10.2 \pm 0.20$  respectively,  $P < 0.0001$ ).

**Key words:** antimicrobials, extract phytopathogenic fungi.

(70 µg/mL;  $9.8 \pm 0.15$ ,  $9.2 \pm 0.15$  y  $10.2 \pm 0.20$  respectivamente,  $P < 0.0001$ ).

**Palabras clave:** Antimicrobianos, extractos de hongos fitopatógenos.

La capacidad de las bacterias para desarrollar resistencia antibacteriana, ha motivado la investigación de nuevos y más potentes antibióticos (Dax, 1997; Demain y Sánchez, 2009). Los metabolitos secundarios fúngicos son una fuente importante de compuestos bioactivos útiles en la agricultura y la medicina, ya que comprenden una amplia gama estructural (Nigam y Singh *et al.*, 2000). Entre los hongos, aquellos que viven en estrecha asociación con otros organismos, suelen ser los que producen metabolitos con mayor bioactividad, ya que los altos niveles de estrés ambiental y las interacciones intensas y frecuentes con otros organismos promueven mayor diversidad metabólica (Dreyfuss y Chapela, 1994). Ejemplo de ello, son los hongos fitopatógenos, causantes de enfermedades antes, durante, después de la cosecha y almacenamiento de los vegetales (García, 2004; Trigos *et al.*, 2008) los cuales constituyen el grupo de microorganismos más importante desde el punto de vista económico en cuanto a su frecuencia de aparición y daño que puedan causar en diferentes cultivos agrícolas (Agrios, 2005).

En México, es prácticamente nula la investigación relacionada con el potencial biomédico de los hongos fitopatógenos; por ello, investigaciones anteriores de nuestro grupo de trabajo han demostrado la capacidad de algunas especies de hongos fitopatógenos para inhibir el crecimiento de cepas bacterianas de interés médico y fitopatógenas (Trigos *et al.*, 2005 y 2006). De igual forma, Espinoza *et al.*, (2008) demostraron que compuestos y extractos crudos de *Idriella* sp. presentaron actividad antibacteriana en contra de bacterias fitopatógenas.

The ability of bacteria to develop antibacterial resistance has encouraged the research of new and more powerful antibiotics (Dax, 1997; Demain and Sánchez, 2009). The secondary fungal metabolites are an important source of bioactive compounds useful in agriculture and medicine, due to their large structural range (Nigam y Singh *et al.*, 2000). Among fungi, those that have a close relation with other organisms are usually the ones that produce metabolites with increased bioactivity, since the high levels of environmental stress and the intense and frequent interactions with other organisms benefit a larger metabolic diversity (Dreyfuss and Chapela, 1994). Examples include phytopathogenic fungi that cause disease before, during, and after the harvest and storage of vegetables (García, 2004; Trigos *et al.*, 2008), which constitute the group of the most important microorganisms from an economic point of view in regard to the frequency of their occurrence and damage that they may cause in different agricultural crops (Agrios, 2005).

In Mexico, research related to the biomedical potential of phytopathogenic fungi is virtually non-existent; therefore; previous research done by our work group has demonstrated the ability of certain phytopathogenic fungal species to inhibit the growth of bacterial and phytopathogenic strains of medical interest (Trigos *et al.*, 2005 and 2006). Likewise, Espinoza *et al.*, (2008) demonstrated that compounds and raw extracts of *Idriella* sp. presented antibacterial activity against phytopathogenic bacteria. It is worth mentioning that the *Gliocladium*, *Geotrichum* and *Rhizopus* genera, which are considered saprophytes and which were used in this study, are likewise associated as causal agents for the decay and death of the royal palm (Sepúlveda, 1998), the acid decay of lemon (Hernández-Montiel *et al.*, 20011) and postharvest decay of tomatoes (Zao *et al.*, 2008), respectively. Furthermore, the *Idriella*

Cabe mencionar que los géneros *Gliocadium*, *Geotrichum* y *Rhizopus* considerados como saprófitos y que fueron utilizados en este estudio, de igual forma están asociados como agentes causales del decaimiento y muerte de la palma real (Sepúlveda, 1998), pudrición ácida del limón (Hernández-Montiel *et al.*, 20011) y pudrición poscosecha del jitomate (Zao *et al.*, 2008) respectivamente. Adicionalmente, el género *Idriella* ha sido reportado como causante de la pudrición de raíz en cultivos de fresa siendo la especie *I. lunata* el agente causal de dicha enfermedad (Nelson y Stephen, 1956). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana de extractos metanol:cloroformo del cultivo de 15 hongos fitopatógenos en contra de cepas bacterianas de interés clínico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Hongos fitopatógenos.** Las cepas fúngicas utilizadas en este estudio (Cuadro 1) fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa (LATEX) y provenían de diferentes cultivos de interés económico del estado de Veracruz, México. Su identificación ha sido soportada mediante claves taxonómicas (Romero-Cova, 1988; Mendoza-Zamora, 1996; Barnett y Hunter, 1998) y para el género *Colletotrichum* se realizaron pruebas de patogenicidad (Márquez-Fernández *et al.*, 2013). De igual forma, se utilizó una cepa de *I. lunata* ATCC 12574, ya que dicha especie mostró actividades antibacterianas según lo reportado por Espinoza *et al.*, (2008). La resiembra de cada uno de los hongos se realizó en cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA, Difco), el periodo de incubación varió para cada especie y osciló entre los 7 y 12 días a  $25 \pm 2$  °C hasta que el micelio cubrió el 75 % de la superficie del medio de cultivo.

genus has been reported as the cause of root rot in strawberry plantations, *I. lunata* being the causal agent of the aforementioned disease (Nelson and Stephen, 1956). As a result, the objective of this work was to evaluate the antibacterial activity of methanol:chloroform extracts from a culture of 15 phytopathogenic fungi compared to bacterial strains of clinical interest.

## MATERIALS AND METHODS

**Phytopathogenic fungi.** The fungal strains used in this study (Table 1) were obtained from the culture collection of the Laboratory of High Technology in Xalapa (LATEX) and came from different cultures of economic interest in the state of Veracruz, Mexico. Their identification has been supported through taxonomic keys (Romero-Cova, 1988; Mendoza-Zamora, 1996; Barnett and Hunter, 1998) and for the *Colletotrichum* genus, pathogenicity assessments were done (Márquez-Fernández *et al.*, 2013). Likewise, a strain of *I. lunata* ATCC 12574 was used, due to the antibacterial activities reported in said species by Espinoza *et al.*, (2008). The cultivation of each one of the fungi was done in Petri dishes with potato dextrose agar (PDA, Difco), the incubation period varied for each species and oscillated between 7 and 12 days at  $25 \pm 2$  °C until the mycelium covered 75 % of the surface of the culture medium.

**Bacterial strains.** The bacterial strains used were: *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -hemolytic (ATCC 25923), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6303), *Staphylococcus epidermidis coagulase* (+) (ATCC 14990), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 17933) (American Type Culture Collection, 2010).

**Cuadro 1.** Cepas de hongos fitopatógenos.  
**Table 1.** Phytopathogenic Fungi strains.

| Cepas fúngicas*                       | Sustrato          | Origen geográfico              |
|---------------------------------------|-------------------|--------------------------------|
| <i>Fusarium moniliforme</i>           | Cítrico (naranja) | Martínez de la Torre, Veracruz |
| <i>Pythium</i> sp.                    | Ornamentales      | Xalapa, Veracruz               |
| <i>Phytophthora parasitica</i>        | Piña              | Tierra Blanca, Veracruz        |
| <i>Colletotrichum musae</i>           | Plátano           | Álamo, Veracruz                |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | Pimiento morrón   | Huatusco, Veracruz             |
| <i>Fusarium solani</i>                | Orquídea          | Xalapa, Veracruz               |
| <i>Geotrichum</i> sp.                 | Madera            | Xalapa, Veracruz               |
| <i>Moniliophthora roreri</i>          | Cacao             | Coatepec, Veracruz             |
| <i>Alternaria citri</i>               | Limón             | Martínez de la Torre, Veracruz |
| <i>Ceratocystis adiposa</i>           | Madera            | Xalapa, Veracruz               |
| <i>Fusarium oxysporum</i>             | Café              | Coatepec, Veracruz             |
| <i>Sclerotium</i> sp.                 | Cebolla           | Perote, Veracruz               |
| <i>Rhizopus</i> sp.                   | Café              | Coatepec, Veracruz             |
| <i>Gliocadium</i> sp.                 | Agave             | Poza Rica, Veracruz            |
| <i>Idriella lunata</i> ATCC 12574     | Raíz de Fresa     | Santa Clara, California, USA   |

Las cepas fueron aisladas e identificadas morfológicamente por claves taxonómicas (Romero-Cova, 1988; Mendoza-Zamora, 1996; Barnett y Hunter, 1998) y por pruebas de patogenicidad para el género *Colletotrichum* (Márquez-Fernández *et al.*, 2013). / The strains were isolated and morphologically identified through taxonomic keys (Romero-Cova, 1988; Mendoza-Zamora, 1996; Barnett y Hunter, 1998) and through pathogenicity tests for the *Colletotrichum* genus (Márquez-Fernández *et al.*, 2013).

**Cepas bacterianas.** Las cepas bacterianas utilizadas fueron: *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -hemolítico (ATCC 25923), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6303), *Staphylococcus epidermis coagulasa* (+) (ATCC 14990), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 17933) (American Type Culture Collection, 2010).

**Cultivo fúngico y extracción.** Para el cultivo líquido de los hongos fitopatógenos, se tomaron círculos de 1 cm de diámetro de cada una de las cepas fúngicas de un cultivo de 7 días de incubación, y se transfirieron asépticamente a matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de caldo de papa y dextrosa, donde se incubaron a  $25 \pm 2$  °C por 15 días manteniéndose en agitación constante a 150 rpm. Una vez concluido el periodo de incubación, se filtró al vacío la biomasa producida para cada cepa fúngica, posteriormente se deshidrató mediante liofilización

**Fungal culture and extraction.** For the liquid culture of the phytopathogenic fungi, circles of 1 cm in diameter were taken from each one of the fungal strains of a culture from 7 days of incubation, and were aseptically transferred to 250 mL Erlenmeyer flasks with 50 mL of potato broth with dextrose, where they incubated at  $25 \pm 2$  °C for 15 days shaking them continuously at 150 rpm. Once the incubation period was over, the biomass produced by each fungal strain was filtered by vacuum filtration. Subsequently, it was dehydrated through lyophilization and was extracted with a mixture of methanol:chloroform (1:1) during 3 days, the solvent excess was eliminated through distillation with reduced pressure (Trigos *et al.*, 2011).

**Antibacterial activity assessment of phytopathogenic fungi extracts against bacterial strains of clinical interest.** The antibacterial



y se extrajo con una mezcla metanol:cloroformo (1:1) durante 3 días, el exceso de disolvente se eliminó por destilación a presión reducida (Trigos *et al.*, 2011).

**Evaluación de actividad antibacteriana de extractos de hongos fitopatógenos en contra de cepas bacterianas de interés clínico.**

La actividad antibacteriana se evaluó siguiendo el método de difusión en agar en disco de Kirby-Bauer (Koneman *et al.*, 2004). Los tratamientos se llevaron a cabo en cajas Petri con agar Luria-Bertani las cuales fueron inoculadas con cada una de las cepas bacterianas en estudio, con una suspensión celular cuya turbidez se igualó con la del tubo 0.5 de la escala de McFarland, equivalente a  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007). Por otro lado, los extractos fúngicos secos, se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical Co.) a una concentración de 1 mg/mL, a partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas para obtener las diferentes concentraciones de extracto que se utilizaron en el ensayo (20, 50 y 70  $\mu\text{g/mL}$ ). Posteriormente, sobre las cajas Petri se colocaron discos de papel filtro (6 mm de diámetro) impregnados con 20  $\mu\text{L}$  de cada uno de las diferentes concentraciones de los extractos de hongos fitopatógenos. Discos impregnados con DMSO sirvieron como control negativo y discos comerciales con 25  $\mu\text{g}$  de ampicilina como control positivo. Finalmente, las cajas Petri se incubaron a  $35 \pm 2$  °C durante 24 h. El diámetro de los halos de inhibición se midió en mm. Los tratamientos se realizaron con tres repeticiones para cada concentración del extracto de cada uno de los hongos fitopatógenos frente a cada una de las cepas bacterianas probadas.

**Análisis estadístico.** Los datos obtenidos se analizaron con una ANOVA de Dunnett, ( $P < 0.0001$ ) para detectar diferencias entre los halos de inhibi-

activity was evaluated following the agar on a Kirby-Bauer disk diffusion method (Koneman *et al.*, 2004). The treatments were done in Petri dishes with Luria-Bertani agar, these were inoculated with each of the bacterial strains under review, with a cellular suspension with a turbidity equal to that of the 0.5 tube on the McFarland scale, equal to  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007). Conversely, the dry fungal extracts were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co.) to a concentration of 1 mg/mL, and from this solution serialized dilutions were done in order to obtain the different extract concentrations that were used in the test (20, 50 and 70  $\mu\text{g/mL}$ ). Subsequently, filter discs (6 mm in diameter) were placed on top of the Petri dishes, each of them permeated with 20  $\mu\text{L}$  of each of the different extract concentrations of the phytopathogenic fungi. Permeated discs with DMSO served as a negative control and commercial discs with 25  $\mu\text{g}$  of ampicillin were used as a positive control. Finally, the Petri dishes were incubated at  $35 \pm 2$  °C during 24 h. The inhibition zone diameters were measured in mm. The treatments were done with three repetitions for each concentration of each of the phytopathogenic fungi against each one of the bacterial strains assessed.

**Statistical Analysis.** The data obtained was analyzed with an ANOVA Dunnett, ( $P < 0.0001$ ) in order to detect differences between the inhibition zone diameters obtained by the extracts compared to the negative control.

## RESULTS AND DISCUSSION

The statistical analysis of the obtained inhibition diameters showed that the *Colletotrichum musae* and *C. gloeosporioides* extracts had significant

ción obtenidos por los extractos en comparación al control negativo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis estadístico de los halos de inhibición obtenidos mostró que los extractos de *Colletotrichum musae* y *C. gloeosporioides* resultaron activos inhibiendo el crecimiento de *Escherichia coli* de manera significativa a las concentraciones de 20, 50 y 70 µg/mL ( $P < 0.0001$ ), en relación al control negativo. Por otro lado, también se registraron diferencias significativas en los halos de inhibición provocados por el extracto de *Idriella lunata* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* β-hemolítico, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en concentraciones de 50 y 70 µg/mL ( $P < 0.0001$ ) en relación al control negativo utilizado (Cuadro 2). Los resultados obtenidos muestran que los extractos de *C. gloeosporioides* y *C. musae* son selectivos para *E. coli*, lo que podría ser útil en el tratamiento de aguas residuales domésticas utilizadas principalmente en la agricultura, especialmente en lugares donde este recurso hídrico escasea (Pedrero *et al.*, 2010). Adicionalmente, el extracto de

inhibition activity on the growth of *Escherichia coli* for the concentrations of 20, 50 and 70 µg/mL ( $P < 0.0001$ ), related to the negative control. Conversely, the significant differences in the inhibition diameters caused by the *Idriella lunata* extract on the growth of *Staphylococcus aureus* β-hemolytic, *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in concentrations of 50 and 70 µg/mL ( $P < 0.0001$ ) in relation to the negative control used (Table 2) were also registered. The results obtained show that the *C. gloeosporioides* and *C. musae* extracts are selective for *E. coli*. This could be useful in the treatment of domestic waste water primarily used in agriculture, especially in places where this resource is scarce (Pedrero *et al.*, 2010). Furthermore, the *Idriella lunata* extract showed activity against both Gram (-) and Gram (+) bacteria.

When working with raw extracts and not with a pure chemical compound, the active concentrations are encouraging as they manifest a highly effective activity, that is also similar to previous results that have demonstrated the antimicrobial activity of other species of phytopathogenic fungi such as *Menisporopsis theobromae* and *Idriella sp.*, against *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Erwinia carotovora*, *E. carotovora* pv. *atroseptica* and

**Cuadro 2.** Diámetros de halos de inhibición bacteriana a partir de extractos fúngicos.

**Table 2.** Bacterial inhibition zone diameters taken from fungal extracts.

| Cepa bacteriana      | Ampicilina<br>25 µg/mL | Halo de inhibición (mm) <sup>1</sup> |             |             |                         |             |             |                          |            |             |
|----------------------|------------------------|--------------------------------------|-------------|-------------|-------------------------|-------------|-------------|--------------------------|------------|-------------|
|                      |                        | <i>C. gloeosporioides</i> (µg)       |             |             | <i>C. musae</i> (µg/mL) |             |             | <i>I. lunata</i> (µg/mL) |            |             |
|                      |                        | 20                                   | 50          | 70          | 20                      | 50          | 70          | 20                       | 50         | 70          |
| <i>S. aureus</i>     | 18.6±0.2               | NA                                   | NA          | NA          | NA                      | NA          | NA          | NA                       | 8.0±0.2*** | 9.2±0.2***  |
| <i>S. pneumoniae</i> | 19.4±0.3               | NA                                   | NA          | NA          | NA                      | NA          | NA          | NA                       | NA         | NA          |
| <i>S. epidermis</i>  | 18.8±0.2               | NA                                   | NA          | NA          | NA                      | NA          | NA          | NA                       | NA         | NA          |
| <i>E. coli</i>       | 18.0±0.1               | 12.2±0.2***                          | 14.6±0.4*** | 17.6±0.2*** | 11.6±0.2***             | 14.4±0.3*** | 15.6±0.3*** | NA                       | 8.2±0.1*** | 9.8±0.2***  |
| <i>P. aeruginosa</i> | 17.8±0.2               | NA                                   | NA          | NA          | NA                      | NA          | NA          | NA                       | 8.8±0.3*** | 10.2±0.2*** |

<sup>1</sup>Promedio de tres repeticiones ± el error estándar de la media (ESM). \*\*\* indican diferencias estadísticas significativas con respecto al control negativo (Dunnnett,  $p < 0.0001$ ). NA. No activo / <sup>1</sup>Average of three repetitions ± the standard error of the measurement (SEM). \*\*\* indicate significant statistical differences regarding the negative control (Dunnnett,  $p < 0.0001$ ). NA. Non-active.

*Idriella lunata* mostró actividad contra bacterias tanto Gram (-) como Gram (+).

Al tratarse de extractos crudos y no de un compuesto químico puro, las concentraciones activas son alentadoras ya que demuestran una actividad altamente efectiva, que además son similares a resultados anteriores que han demostrado la actividad antimicrobiana de otras especies de hongos fitopatógenos como *Menisporopsis theobromae* e *Idriella* sp, en contra de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Erwinia carotovora*, *E. carotovora* pv. *atroseptica* y *Agrobacterium tumefaciens* (Trigos *et al.*, 2005). Adicionalmente, *Curvularia lunata*, *Phytophthora drechsleri*, *Phytophthora capsici*, *Gliocladium* spp, *Neocosmospora vasinfecta* resultaron activas contra bacterias como *E. coli* y *P. aeruginosa* (Trigos *et al.*, 2006). De igual forma, Espinoza *et al.* (2008), demostraron que el 5-hidroximetil-2-furaldehído y el 1-n-Butil-β-D-fructopiránosido obtenidos del cultivo de *Idriella* sp mostraron actividades antibacterianas en contra de bacterias fitopatógenas *Xanthomonas axonopodis*, *Pectobacterium carotovorum*, *P. chrysanthemi* y *Erwinia amylovora* con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 0.625 mg/mL.

## CONCLUSIONES

Si bien los hongos fitopatógenos siguen siendo la causa de la disminución parcial y total del rendimiento de los cultivos y como consecuencia elevadas pérdidas económicas; los resultados obtenidos colocan a las cepas de *Colletotrichum musae*, *C. gloeosporioides* e *Idriella lunata*, por su actividad antibacteriana, como fuentes potenciales de compuestos bioactivos contra cepas bacterianas de interés médico causantes de infecciones comunes en nuestro país. Por lo anterior, este trabajo abre la posibilidad de continuar explorando el aprovecha-

*Agrobacterium tumefaciens* (Trigos *et al.*, 2005). Additionally, *Curvularia lunata*, *Phytophthora drechsleri*, *Phytophthora capsici*, *Gliocladium* spp, *Neocosmospora vasinfecta* resulted active against bacteria such as *E. coli* and *P. aeruginosa* (Trigos *et al.*, 2006). Similarly, Espinoza *et al.* (2008), demonstrated that the 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde and 1-n-Butyl- β-D-fructopyranoside obtained from the *Idriella* sp culture showed antibacterial activities against the phytopathogenic bacteria *Xanthomonas axonopodis*, *Pectobacterium carotovorum*, *P. chrysanthemi* and *Erwinia amylovora* with a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 0.625 mg/mL.

## CONCLUSIONS

Even though phytopathogenic fungi remain as the main cause of the partial or total yield decrease of crops and thus represent high financial losses, the results obtained place the *Colletotrichum musae*, *C. gloeosporioides* and *Idriella lunata* strains, for their antibacterial activity, as potential sources of bioactive compounds against bacterial strains of medical interest that represent the cause of common infections in our country. As a result, this work presents the possibility of continued research on the utilization of phytopathogenic fungi for medical applications, previous chemical, pharmacological, toxicological and clinical studies.

### Acknowledgements

This work was funded by the FOMIX CONACYT Veracruz State Government (VER-2009-C03-128039) project, and the SEP-CONACYT basic-2012 (181820) project. María de la Soledad Lagunes-Castro, thanks CONACyT for the doctoral fellowship (249756).

~~~~~ Finaliza la versión en Inglés ~~~~~

miento de los hongos fitopatógenos en aplicaciones médicas, previos estudios químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el proyecto FOMIX CONACYT Gobierno del Estado de Veracruz (VER-2009-C03-128039), y el proyecto SEP-CONACYT básica-2012 (181820). María de la Soledad Lagunes-Castro agradece al CONACyT la beca de doctorado (249756).

LITERATURA CITADA

- Agrios GN. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Academic Press. New York, USA. 922p.
- ATCC. American Type Culture Collection. 2010. Cells and microorganisms, bacterial products. <http://www.atcc.org/Products/Cells%20and%20Microorganisms/Bacteria.aspx> (consulta, marzo 2014).
- Barnett HL y Hunter BB. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. USA. 218p
- Dax SL. 1997. Antibacterial Chemotherapeutic Agents. First edition. Blackie Academic & Professional, Londres, UK. 396p.
- Demain AL y Sánchez S. 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. The Journal of Antibiotics 62: 5-16.
- Dreyfuss MM y Chapela IH. 1994. Potential of fungi in the discovery of novel, low molecular weight pharmaceuticals. Pp: 49-80 Gullo, VP. (eds.). In The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential. Butterworth-Heinemann, Boston, USA. 461p.
- Espinoza C, Viniestra-González G, Loera O, Heredia G y Trigos Á. 2008. Antimicrobial activity against plant pathogens by cruded extracts and compounds from *Idriella sp.* Revista Mexicana de Micología 26: 9-15.
- García CV. 2004. Introducción a la microbiología. Segunda Edición. Editorial UNED, San José, Costa Rica. 256p.
- Hernández-Montiel LG, Holguín-Peña J, López-Aburto MG y Troyo-Diéguez E. 2011. Control poscosecha de *Geotrichum citri-aurantii* en limón mexicano (*Citrus aurantifolia* [christm.] swingle) mediante levaduras marinas y epífitas. Universidad y Ciencia 27(2):191-198.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenber PC y Winn WC. 2004. Diagnóstico microbiológico. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. 1696p.
- Márquez-Fernández O, Cano M, Salinas A, Guzmán-López O, Espinoza C y Trigos A. 2013. Composición química de glomérulos producidos por *Colletotrichum gloeosporioides*. Revista Mexicana de Micología 38:1-7.
- Mendoza-Zamora C. 1996. Enfermedades fungosas de hortalizas. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 85 p.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. CLSI document M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA. 177p.
- Nelson PE y With S. 1956. An undescribed fungus causing a root rot of strawberry. Mycology 48: 548-551.
- Nigam P y Singh D. 2000. Metabolic pathways: production secondary metabolites-fungi. Pp: 1319-1328 In: Encyclopedia of Food Microbiology (Robinson RK, Batt CA, Patel PD. eds.). Academic Press, London, UK. 2372p.
- Pedrero F, Kalavrouziotis I, Alarcón JJ, Koukoulakis P y Asano T. 2010. Use of treated municipal wastewater in irrigated agriculture - Review of some practices in Spain and Greece. Agriculture Water Management 97(9):1233-1241.
- Romero-Cova, S. 1988. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo, México. 347p.
- Sepúlveda-Chavera GF. 1998. *Gliocladium vermoeseni* (Biouge) Thom.: Agente causal del decaimiento y muerte de la Palma real (*Chrysalidocarpus lutescens* L.) en América. IDESIA 15: 59-63.
- Trigos Á, Mendoza G, Luna M, Heredia G y Arias RM. 2005. Evaluación antibacteriana de hongos microscópicos del suelo y restos vegetales. Revista Mexicana de Micología 20:89-92.
- Trigos Á, Castellanos O, Salinas A, Espinoza C y Yáñez MJ. 2006. Antibiotic activity of several phytopathogenic fungi. Micología Aplicada Internacional 18(1):3-6.
- Trigos Á, Ramírez K y Salinas A. 2008. Presencia de hongos fitopatógenos en frutas u hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. Revista Mexicana de Micología 28:125-129.
- Trigos Á, Mendoza G, Espinoza C, Salinas A, Fernández JJ y Norte M. 2011. The role of macrosporin in necrotic spots. Phytochemistry Letters 4:122-125.
- Zhao Y, Tu K, Shao X, Jing W y Sua Z. 2008. Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. Postharvest Biology and Technology 49:113-120.

Escala Diagramática de Severidad para el Complejo Mancha de Asfalto del Maíz

Diagrammatic Scale Severity for Tar Spot Complex in Maize

Lervin Hernández Ramos, Instituto de Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Edo. México, CP 56230, México. **José Sergio Sandoval Islas**, Instituto de Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Edo. México, CP 56230, México. Correspondencia: (lervin.hernandez@colpos.mx).

Recibido: Julio 22, 2014

Aceptado: Diciembre 20, 2014

Hernández Ramos L y Sandoval Islas JS. 2015. Escala diagramática de severidad para el Complejo Mancha de Asfalto del maíz. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 95-103.

Resumen. El complejo mancha de asfalto del maíz, inducido por los hongos *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis*, es una enfermedad de importancia económica en México, debido a que provoca severas pérdidas en rendimiento. Dada su importancia se requieren métodos estandarizados de cuantificación de los daños ocasionados por la enfermedad, que permitan realizar estudios epidemiológicos reproducibles; con este propósito fue elaborada una escala logarítmica de severidad con los intervalos y punto medio de cada clase de 0(0-0), 3(1-6), 12(7-22), 38(23-55), 72(56-84), 91(85-95) y 98(96-100) % de área foliar afectada, analizándose su exactitud, precisión y reproducibilidad. La evaluación consideró a diez evaluadores y 50 plantas con distintos niveles de severidad, determinadas con el Software ImageTool 3.0. La precisión y exactitud se calculó mediante un análisis de regresión lineal, entre la severidad real y estimada. Todos los evaluadores mostraron una tendencia

Abstract. The tar spot complex of maize, induced by the fungi *Phyllachora maydis* and *Monographella maydis*, is a disease of economic importance in Mexico and Central America because it causes severe yield losses. Given the growing importance, standardized methods are required to quantify disease that allow for reproducible epidemiological methods. For this purpose a logarithmic scale of severity was developed with intervals and midpoints of 0(0-0), 3(1-6), 12(7-22), 38(23-55), 72(56-84), 91(85-95) and 98(96-100)% of the affected leaf area, analyzing accuracy, precision and reproducibility. The evaluation considered ten evaluators and 50 plants with different levels of severity, determined by the Image Tool 3.0 Software. The precision and accuracy was determined by a simple linear regression analysis between actual and estimated severity. All evaluators tended to overestimate the disease, and recorded values of the b_1 coefficient statistically equal to 1 ($P < 0.01$), so that the disease evaluation with the proposed scale gives values close to real results. High levels of accuracy were observed; r^2 was comprised between the range of 0.71 and 0.91, indicating that the scale can be successfully implemented in the evaluation of the tar spot complex disease.

a sobreestimar la enfermedad; y registraron valores del coeficiente b_1 estadísticamente igual a 1 ($P < 0.01$), por lo que la evaluación del CMA con la escala propuesta arroja resultados cercanos a los valores reales. Se observaron buenos niveles de precisión, la r^2 estuvo comprendida entre el rango 0.71 a 0.91; indicando que la escala puede ser implementada exitosamente en la evaluación de los daños de la enfermedad.

Palabras clave: *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis*, *Zea mays*.

El Complejo Mancha de Asfalto (CMA), asociado a los hongos *Phyllachora maydis* Maubl. y *Monographella maydis* Müller & Samuels, es una enfermedad que se ha convertido en el principal factor limitante en la producción de maíz (*Zea mays* L.) en diversas zonas del trópico húmedo, subhúmedo y zonas de transición (Hock *et al.*, 1989), en distintas regiones de México y Centroamérica. La incidencia del CMA provoca pérdidas severas en rendimiento y deteriora la calidad del forraje, además, tiene el potencial para destruir las parcelas en su totalidad (Pereyda *et al.*, 2009). En México, la enfermedad se considera potencialmente importante en unas 800 mil hectáreas distribuidas en los Estados de Michoacán, Puebla, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Gómez *et al.*, 2013).

A nivel de campo, se ha observado que siempre el maíz es primeramente infectado por *P. maydis*, produciendo pequeñas manchas negras en forma de costras carbonosas sobresalientes, que por su aspecto se les denomina manchas de asfalto (Hock *et al.*, 1989). Posteriormente se forma un halo necrótico alrededor de cada una de las lesiones de *P. maydis* debidas a la infección secundaria de *M. maydis*, dando origen al denominado síntoma ojo de pescado (Hock *et al.*, 1992). De todos los organismos asociados *M. maydis*, el causante de

Key words: *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis*; *Zea mays*.

The Tar Spot Complex (TSC), associated with the *Phyllachora maydis* Maubl and *Monographella maydis* Müller & Samuels fungi, is a disease that has turned into the main limiting factor for maize production (*Zea mays* L.) in a number of humid/sub-humid, tropical regions and transitional zones (Hock *et al.*, 1989) in several regions of Mexico and Central America. The incidence of TSC causes severe yield losses and deteriorates the quality of the fodder; furthermore, it has the potential to entirely destroy parcels of land (Pereyda *et al.*, 2009). In Mexico, the disease is considered potentially significant in around 800 thousand hectares distributed among the states of Michoacán, Puebla, Veracruz, Guerrero, Oaxaca and Chiapas (Gómez *et al.*, 2013).

In the field, it has been observed that the maize is first infected by *P. maydis*, causing small black stains in the form of exalted carbonaceous scabs, that due to their appearance are denominated asphalt stains (Hock *et al.*, 1989). Subsequently, a necrotic diameter is formed around each one of the lesions of *P. maydis* due to the secondary infection of *M. maydis*, originating the so called fish-eye symptom (Hock *et al.*, 1992). From all the organisms associated with *M. maydis*, the one that causes foliar necrosis has the most devastating effect. Under favorable conditions, the foliage of the plant may completely dry out in less than eight days due to the fusion of the lesions of the two pathogenic organisms and due to the possible production of a toxin (Hock *et al.* 1995).

Given the increasing importance of the Tar Spot Complex, standardized methods for the quantification of the disease are required, methods that allow the conduction of accurate, precise, and reproducible epidemiological studies;

la necrosis foliar, tienen el efecto más devastador; bajo condiciones favorables el follaje de la planta puede secarse completamente en menos de ocho días debido a la fusión de las lesiones de los dos organismos patogénicos y a la posible producción de una toxina (Hock *et al.* 1995).

Dada la creciente importancia del CMA, se requieren de métodos estandarizados de cuantificación de la enfermedad que permitan realizar estudios epidemiológicos reproducibles, exactos y precisos; entendiendo como exactitud a la proximidad que tiene un valor estimado con el valor real, precisión como la variación o repetitividad asociadas con una estimación; y reproducibilidad a la ausencia de variación en las estimaciones cuando diversos evaluadores cuantifican la misma característica (Nascimento *et al.*, 2005).

Dentro de los métodos para medir la intensidad de una enfermedad el uso de escalas logarítmicas diagramáticas es el más ampliamente utilizado. Estas escalas consisten en la representación ilustrada de una serie de plantas o partes de plantas mostrando los síntomas de una enfermedad en diferentes grados de severidad (Nascimento *et al.*, 2005) y están basadas en el principio de Weber-Fechner que establece que la agudeza visual del daño es proporcional al logaritmo del estímulo hasta en un 50% de severidad y a partir de este valor, la relación es inversamente proporcional al logaritmo del estímulo ocasionado por la cantidad de tejido sano restante (Mora *et al.*, 2000).

A pesar de la creciente importancia del complejo mancha de asfalto del maíz y la consecuente necesidad de llevar a cabo estudios epidemiológicos o de control, no se tiene la existencia de un método estandarizado de cuantificación de la enfermedad que provea de resultados fácilmente reproducibles entre investigadores o instituciones, por lo que el objetivo de esta investigación fue diseñar y validar una escala logarítmica diagramática de severidad

understanding ‘accuracy’ as the proximity that an estimated value has to the real value, ‘precision’ as the variation or repeatability associated with an estimation, and ‘reproducibility’ as the absence of change in the estimations when several evaluators quantify the same characteristics (Nascimento *et al.*, 2005).

Among the methods of measurement for the intensity of a disease, the use of diagrammatic logarithmic scales is the most widely used. These scales consist in the representation of a series of plants or parts of plants that show the symptoms of a disease in varying degrees of severity (Nascimento *et al.*, 2005) and are based on the Weber-Fechner law which states that the visual acuity of the damage is proportional to the stimulus logarithm up until a 50% severity, and from this value on, the relation is inversely proportional to the stimulus logarithm caused by the quantity of remaining healthy tissue (Mora *et al.*, 2000).

Despite the increasing importance of TSC in maize and the resulting need to carry out epidemiological or control studies, there is no standardized quantification method of the disease that provides easily reproducible results among investigators or institutions; therefore, the objective of this investigation was to design and validate a diagrammatic logarithmic severity scale for the maize – *Phyllachora maydis* and *Monographella maydis* – pathosystem that allows the evaluation of the damage caused by the disease in fields, analyzing the accuracy, precision and reproducible values generated with its use.

Design of the diagrammatic logarithmic scale.

The methodology proposed by Mora *et al.* (2000) was employed, utilizing 50 leaves with a wide range of severity levels, originating from different hybrids with different genetic basis, which allowed the representation of different severity levels.

para el patosistema maíz – *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* que permita la evaluación de los daños de la enfermedad en campo, analizando los valores de exactitud, precisión y reproducibilidad generados con su utilización.

Diseño de la escala logarítmica diagramática. Se empleó la metodología propuesta por Mora *et al.* (2000), incluyendo 50 hojas con un amplio rango de severidad, provenientes de diferentes híbridos con una base genética distinta, lo que permitió que quedaran representados los distintos niveles de severidad. La documentación fotográfica fue obtenida en las parcelas de la estación experimental Agua Fría CIMMYT, Puebla y en comunidades de Chilpancingo en Guerrero, durante 2013. Mediante el software Image Tool 3.0 se determinó el área total foliar y el área total enferma de cada imagen digitalizada; la proporción de tejido sano y enfermo permitió calcular el porcentaje de severidad de la enfermedad. La escala logarítmica se generó mediante el programa 2-Log V1.0 propuesto por Mora *et al.* (2000).

Validación de la escala diagramática. Se utilizó una secuencia de 50 fotografías de hojas y plantas de maíz con diversos niveles de severidad del CMA, determinándose previamente el área afectada de cada una de ellas. La severidad de cada imagen fue evaluada con ayuda de la escala por diez evaluadores, cinco de ellos con experiencia en la cuantificación de la severidad de enfermedades y cinco sin experiencia directa en el ámbito fitopatológico. La exactitud y precisión de cada evaluador fue determinada por medio de un análisis de regresión lineal simple tal como lo describen Nutter *et al.* (1991).

La exactitud de cada evaluador fue determinada mediante la prueba T aplicada al intercepto de la regresión lineal (b_0), para verificar la hipótesis

The photographic documentation was obtained from the parcels in the experimental station Agua Fría CIMMYT, Puebla and from communities in Chilpancingo, Guerrero in 2013. The total foliar area and the total diseased area of each digitalized image was determined through the Image Tool 3.0 software; the ratio of the healthy and diseased tissue allowed the calculation of the severity of the disease. The logarithmic scale was generated through the 2-Log V1.0 program, proposed by Mora *et al.* (2000).

Validation of the diagrammatic scale. A sequence of 50 photographs of leaves and maize plants with different TSC severity levels was used, previously determining the affected area of each one of them. The severity of each image was evaluated by ten evaluators with the help of the scale, five of them with experience in the quantification of disease severity and five without direct experience in the phytopathological area. The accuracy and precision of each evaluator was determined through a simple analysis of linear regression as described by Nutter *et al.* (1991).

The accuracy of each evaluator was determined through the T test applied to the intercept of the linear regression (b_0), to verify the $H_0: b_0=0$ hypothesis; and with the coefficient of the slope of the line (b_1) to estimate if it was different from 1 ($H_0: b_1=1$), with $P \leq 0.01$. The accuracy of the tests was estimated with the coefficient of determination (r^2) of the same linear regression and with the absolute deviation of the error. The simple linear regression analysis was done through the GLM procedure of the SAS 9.0 statistical package.

In the field, the maximum severity value of TSC observed was 100 %, causing the premature senescence and death of the entire plant; conversely, the inferior limit had 0% severity. Considering both limits, the diagrammatic logarithmic scale

$H_0: b_0=0$; y con el coeficiente de la pendiente de la recta (b_1) para estimar si fue diferente de 1 ($H_0: b_1=1$), con $P \leq 0.01$. La precisión de los ensayos fue estimada con el coeficiente de determinación (r^2) de la misma regresión lineal y por la varianza absoluta del error. El análisis de regresión lineal simple fue realizado mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS 9.0.

A nivel de campo el valor máximo de severidad del CMA observado fue de 100%, causando senescencia y muerte prematura de toda la planta; en contraste, el límite inferior resultó con 0 % de severidad. Considerando ambos límites, la escala logarítmica diagramática de severidad estuvo constituida por siete clases, representadas por los intervalos de 0(0-0), 3(1-6), 12(7-22), 38(23-55), 72(56-84), 91(85-95) y 98(96-100) % de área foliar necrosada (Figura 1).

La exactitud, representada por el grado de proximidad de los valores estimados a los valores

was constituted by seven classes, represented by the intervals 0(0-0), 3(1-6), 12(7-22), 38(23-55), 72(56-84), 91(85-95) and 98(96-100)% of the necrotic foliar area (Figure 1).

The accuracy, represented by the degree of proximity of the estimated values to the real values (Nutter *et al.* 1991), measured by the b_0 intercept and by the b_1 coefficient of the linear model, was greater for the evaluators with experience in the quantification of diseases (Table 1). The values of the b_0 intercept were closer to zero for the first group. The value of the b_0 intercept was positive in almost all cases, which indicates that there is a tendency to overestimate the severity of the disease; this tendency was greater for the evaluators without experience. Based on the null hypothesis ($a=0$ o $b=1$), the coefficient b_1 was statistically equal to 1 ($P < 0.01$) for most of the evaluators, indicating that the assessment of TSC generates results that are close to the real values, even when there is a

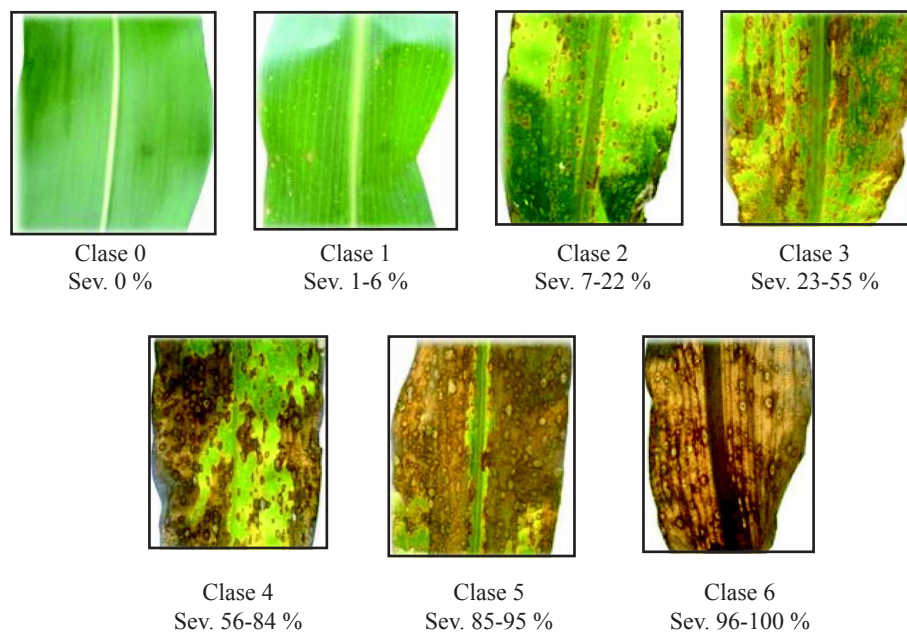


Figura 1. Escala diagramática de severidad para el Complejo Mancha de Asfalto del Maíz.
Figure 1. Diagrammatic severity scale for the Tar Stain Complex in Maize.

reales (Nutter *et al.* 1991), medida por el intercepto b_0 y el coeficiente b_1 del modelo lineal, fue mayor para los evaluadores con experiencia en la cuantificación de enfermedades (Cuadro 1). Los valores del intercepto b_0 fueron más cercanos a cero para el primer grupo. El valor del intercepto b_0 fue positivo en casi todos los casos, lo que indica que hay una tendencia hacia sobreestimar la severidad de la enfermedad; esta tendencia fue mayor en los evaluadores sin experiencia. En base a la hipótesis de nulidad ($a=0$ o $b=1$), el coeficiente b_1 fue estadísticamente igual a 1 ($P<0.01$) para la mayoría de los evaluadores, indicando que la evaluación del CMA arroja resultados cercanos a los valores reales, aún cuando existe la tendencia hacia sobreestimar los mismos; Nascimiento *et al.* (2005) señalan que una sobreestimación en la mayoría de los evaluadores indica la presencia de desvíos positivos constantes para todos los niveles de severidad de la enfermedad.

De acuerdo a Sherwood *et al.*, (1983) las hojas con severidades similares pero con un número

tendency to overestimate them. Nascimiento *et al.* (2005) point out that an overestimation of the majority of evaluators indicates the presence of positive constant deviations for all levels of severity of the disease.

According to Sherwood *et al.*, (1983) the leaves with similar severities but with a different number of lesions generate a tendency to overestimate the disease, mainly when the number of lesions is high and their size is small, such is the case of TSC, where the usual symptom denominated “fish-eye” is presented in a high number of lesions. The overestimation of the severity levels using logarithmic scales has been common in several pathosystem. This has been reported, among others, by Barbosa *et al.*, (2006) for *Puccinia horiana*; and Aquino *et al.*, (2008) for *Ramularia gossypii*.

The precision (reproducibility or variation associated with an estimation), estimated by the coefficient of determination (r^2) and by the variability of the absolute errors (Nutter *et al.*, 1991),

Cuadro 1. Estimación de los parámetros de intercepción (b_0), pendiente (b_1) y coeficiente de determinación (r^2) del análisis de regresión lineal simple calculado entre la severidad real y estimada del CMA, realizada por 10 evaluadores con y sin experiencia en la cuantificación de enfermedades.

Table 1. Estimate of the interception parameters (b_0), slope (b_1), and coefficient of determination (r^2) of the simple linear regression analysis calculated between the real and estimated severity of TSC, carried out by 10 evaluators with and without experience in the quantification of diseases.

| Evaluador | Con Experiencia | | | Evaluador | Sin Experiencia | | |
|-----------|-----------------|-------|-------|-----------|-----------------|-------|-------|
| | b_0 | b_1 | r^2 | | b_0 | b_1 | r^2 |
| 1 | 2.52 | 1.01 | 0.91 | 6 | 12.53** | 1.01 | 0.70 |
| 2 | 2.63 | 0.96 | 0.81 | 7 | 12.14** | 0.97 | 0.80 |
| 3 | 0.09 | 0.99 | 0.83 | 8 | 5.10* | 0.93 | 0.72 |
| 4 | 3.79 | 1.04 | 0.92 | 9 | -5.73* | 0.94 | 0.72 |
| 5 | 2.25 | 0.95 | 0.85 | 10 | 20.91** | 0.89* | 0.65 |
| Media | 2.26 | 0.99 | 0.87 | Media | 8.99 | 0.95 | 0.72 |

*, ** Situación donde el valor del intercepto de la recta (b_0) o el coeficiente de la pendiente (b_1) fueron estadísticamente diferentes de 0 y 1 respectivamente; basado en la prueba de T con $\alpha=0.05$ y 0.01, respectivamente / *, **Situation where the intercept value of the line (b_0) or the coefficient of the slope (b_1) were statistically different from 0 and 1 respectively; based on the T test with $\alpha=0.05$ and 0.01, respectively.

diferente de lesiones generan una tendencia a sobreestimar la enfermedad, principalmente cuando el número de lesiones es muy alto y su tamaño pequeño, tal es el caso de CMA, donde el típico síntoma denominado “ojo de pescado” se presenta en un gran número de lesiones. La sobreestimación de los niveles de severidad utilizando escalas logarítmicas ha sido común en varios patosistemas, así lo han reportado entre otros, Barbosa *et al.*, (2006) para *Puccinia horiana*; y Aquino *et al.*, (2008) para *Ramularia gossypii*.

La precisión (repetitividad o variación asociada con una estimación), estimada por el coeficiente de determinación (r^2) y por la varianza de los errores absolutos (Nutter *et al.*, 1991) fue mucho mayor en aquellos evaluadores con experiencia, fluctuando en el rango de 0.81 a 0.92 (Figura 2). Los niveles de precisión observada indican que el primer contacto con la escala es adecuado para ser implementada exitosamente en la evaluación del CMA. Al respecto, Michereff *et al.*, (2006) determinaron valores de precisión adecuados en una primera evaluación con el uso de escalas; en contraparte, Tovar *et al.*, (2002) tuvieron que familiarizar a los evaluadores para incrementar los valores de precisión y exactitud.

Los valores de precisión observados en los evaluadores sin experiencia son aceptables; un entrenamiento previo podría tener una influencia positiva en la calidad de las evaluaciones. Esto ha sido demostrado para otros patosistemas: Barbosa *et al.* (2006) y Aquino *et al.*, (2008) elevaron considerablemente la exactitud y precisión de las estimaciones de evaluadores sin experiencia luego de entrenamientos previos; los mismos autores señalan que no hubo una mejora significativa para aquellos evaluadores experimentados.

La reproducibilidad de la escala fue alta, dado que diferentes evaluadores, utilizando una misma escala en la evaluación del material, estimaron porcentajes similares de severidad. La regresión lineal

was greater for those evaluators with experience, fluctuating in the range of 0.81 to 0.92 (Table 1; Figure 2). The precision levels observed indicate that the first contact with the scale is appropriate for successful implementation in the evaluation of TSC. In regards to this, Michereff *et al.*, (2006) determined precision values appropriate for a first evaluation with the use of scales; conversely, Tovar *et al.*, (2002) had to familiarize the evaluators in order to increase precision and accuracy.

The precision values observed in the evaluators without experience are acceptable; prior training could have a positive influence on the quality of the evaluations. This has been demonstrated for other pathosystems: Barbosa *et al.*, (2006) and Aquino *et al.*, (2008) considerably elevated the accuracy and precision of the estimations of the evaluators without experience after prior training. The same author indicates that there was no significant improvement for the experienced evaluators.

The reproducibility of the scale was high using the same scale for the assessment of the material, given different evaluators estimated similar severity percentages. The linear regression of the severities estimated by the evaluators produced coefficients of determination that varied within the range of 65 to 91 (Table 1). Therefore, the use of the diagrammatic scale for the evaluation of TSC generates a high concurrence with the real severity values, reflected in a high precision among the evaluators.

Hock *et al.*, (1992) developed a scale that was also based on the logarithmic law for the in-field evaluation of the severity of TSC; however, the obtained precision values were not adequate. This was due to the complicated quantification system and to the elevated number of classes with which it was developed; furthermore, it considered the symptoms caused by both infectious agents separately. In this study, the symptoms of *P. maydis* and *M. maydis* were considered together, resulting

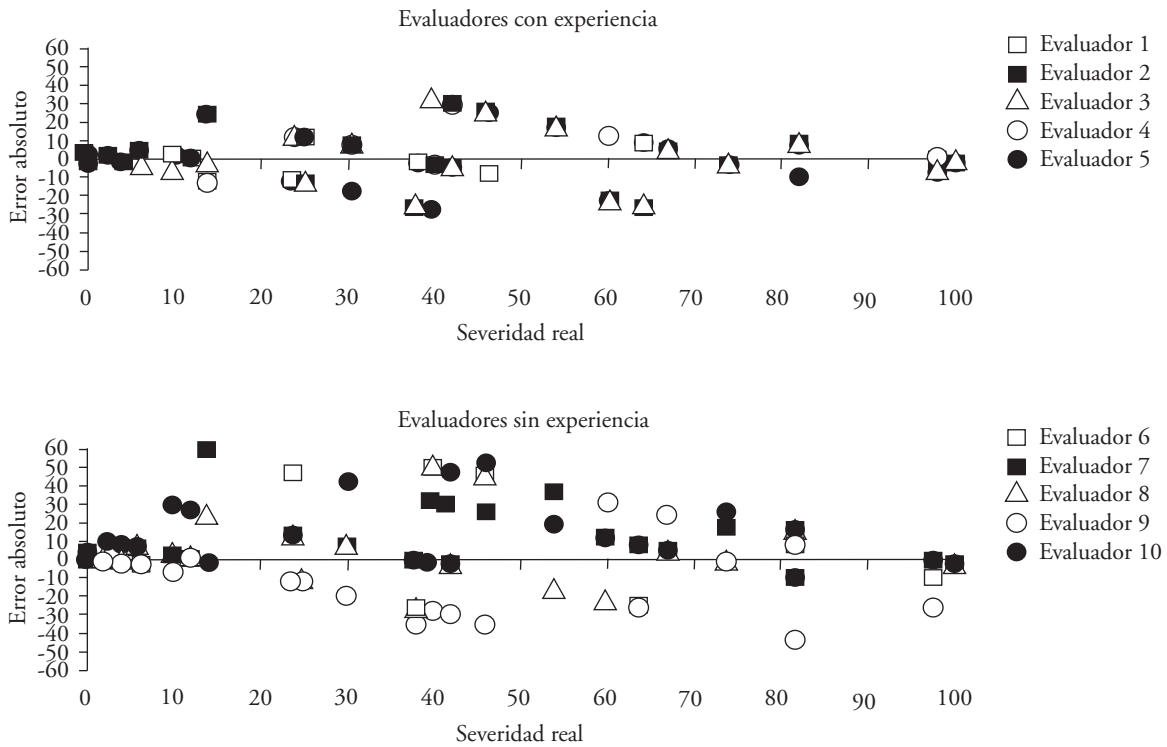


Figura 2. Errores absolutos (severidad real - severidad estimada) de las evaluaciones del CMA con el uso de la escala logarítmica; en la parte superior los evaluadores con experiencia en la cuantificación de enfermedades, en la parte inferior los evaluadores sin experiencia.

Figure 2. Absolute errors (real severity – estimated severity) of the TSC evaluations with the logarithmic scale; at the top: experienced evaluators in the quantification of diseases, at the bottom, inexperienced evaluators.

de las severidades estimadas por los evaluadores produjo coeficientes de determinación que variaron en el rango de 65 a 91 (Cuadro 1). Por lo tanto, el uso de la escala diagramática para la evaluación del CMA produce una alta concordancia con los valores reales de severidad, reflejado en una alta precisión entre los evaluadores.

Hock *et al.*, (1992) desarrollaron una escala basada también en el principio logarítmico para la evaluación en campo de la severidad del CMA, sin embargo, los valores de precisión obtenidos no resultaron adecuados, esto debido al complicado sistema de cuantificación y al número elevado de clases con el cual fue desarrollada; además consi-

in the observance of the combined symptoms of the disease by the evaluator.

Finally, the use of standardized systems for the quantification of maize diseases, and those of any other crop, proves to be a powerful tool as it allows the perfect comparison of experiments carried out by different institutions and investigators. The diagrammatic logarithmic scale for the TSC proposed in this study represents a standardized quantification method for the disease that will help obtain easily reproducible results, due to its high levels of accuracy and precision among several evaluators, therefore, it can be used as supporting material for different

deraba de manera separada los síntomas producidos por ambos agentes infecciosos. En este estudio se consideraron conjuntamente los síntomas de *P. maydis* y *M. maydis* dando como consecuencia que el evaluador se fije de manera conjunta en los síntomas de la enfermedad.

Finalmente, el uso de sistemas estandarizados para la cuantificación de enfermedades en maíz, y en cualquier otro cultivo, resulta ser una poderosa herramienta dado que permite la perfecta comparación de experimentos llevados a cabo por diferentes instituciones e investigadores. La escala logarítmica diagramática para el CMA propuesta en este estudio representa un método estandarizado de cuantificación de la enfermedad que ayudará a obtener resultados fácilmente reproducibles, ya que provee de altos niveles de exactitud y precisión entre diversos evaluadores, por lo que puede ser utilizada como material de apoyo para estudios de diversa índole relacionados con la cuantificación de la severidad del CMA.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a todos los evaluadores del Colegio de Postgraduados que participaron en las etapas de validación de la escala logarítmica.

LITERATURA CITADA

- Aquino LA, Berger PG, Rodríguez FA, Zambolim L, Hernández FR, Miranda LM. 2008. Elaboração e validação de escala diagramática para quantificação da mancha de ramularia do algodoeiro. *Summa Phytopathologica* 34(4):361-363.
- Barbosa MA, Michereff SJ, Mora AG. 2006. Elaboration and validation of diagrammatic key to evaluate white rust severity in *Chrysanthemum*. *Summa Phytopathologica* 32:57-62.
- Gómez MN, González CM, Cantú AM, Sierra MM, Coutiño EB, Manjarrez SM. 2013. "H-563", Híbrido de maíz tropical tolerante a la enfermedad "Mancha de asfalto". *Revista Fitotecnia Mexicana* 36(1):81-83.
- Hock J, Kranz J, Renfro BL. 1989. El "complejo mancha de asfalto" del maíz, su distribución geográfica, requisitos ambientales e importancia económica en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 7(2):129-135.
- Hock J, Kranz J, Renfro BL. 1992. Tests of standard diagrams for field use in assessing the tarspot disease complex of maize (*Zea mays*). *Tropical Pest Management* 38:314-318.
- Michereff SJ, Noronha MA, Andrade DEG, Oliveira EP, Xavier FMS, Moreira PAA. 2006. Development and validation of diagrammatic key for *Cercospora* leaf spot of sweet pepper. *Summa Phytopathologica* 32(3):260-266.
- Mora AG, Rivas VP, Góngora CC, Tovar SA, Cristóbal AJ, Loeza KE, Michereff JS, Marinelli A, Osada VK. 2000. Sistemas computarizados en la epidemiología: 2-Log ver. 1.0 y su aplicación en el diseño de escalas diagramáticas logarítmicas. XXIX Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. Puerto Vallarta, México.
- Nascimento RPA, Michereff JS, De la Rosa LR, Gómez MAA. 2005. Elaboração e validação de escala diagramática para cancro bacteriano da videira. *Summa Phytopathologica* 31: 59-64.
- Nutter FW, Teng PS, Shokes FM. 1991. Disease assessment terms and concepts. *Plant Disease* 75: 1187-1188.
- Pereyda HJ, Hernández MJ, Sandoval IJS, Aranda OS, De León GC, Gómez MN. 2009. Etiología y manejo de la mancha de asfalto (*Phyllachora maydis* Maubl.) del maíz en Guerrero, México. *Agrociencia* 43(5):511-519.
- Sherwood RT, Berg CC, Hoover MR, Zeiders KE. 1983. Illusions in visual assessment of *Stagonospora* leaf spot of orchardgrass. *Phytopathology* 73(2): 173-177.
- Tovar SA, Hernández MM, Cristóbal AJ, Romero HR, Mora AG. 2002. Escala logarítmica diagramática de severidad de la mancha negra (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) en Chirimoyo (*Annona cherimola* M.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:103-109.

~~~~~ Finaliza la versión en Inglés ~~~~~

# Etiología de la pudrición del cogollo de la piña (*Ananas comosus*. L. Merrill) cultivar MD2 en Isla, Veracruz, México

## Etiology of the heart rot of pineapple (*Ananas comosus*. L. Merrill) MD2 cultivar in Isla, Veracruz, México

César Joel Espinosa-Rodríguez<sup>1</sup>, Daniel Nieto-Angel<sup>2\*</sup>, Carlos De León-García de Alba<sup>2</sup>, Ángel Villegas-Monter<sup>1</sup>, Luis Alfonso Aguilar-Pérez<sup>2</sup>, Victoria Ayala-Escobar<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Recursos Genéticos y Productividad-Fruticultura. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. <sup>2</sup>Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo Texcoco, Edo. de México C.P. 56230. \*Correspondencia: (dnieto@colpos.mx).

**Recibido:** Julio 19, 2014

**Aceptado:** Diciembre 28, 2014

Espinosa Rodríguez CJ, Nieto Ángel D, De León García de Alba C, Villegas Monter A, Aguilar Pérez LA y Ayala Escobar V. 2015. Etiología de la pudrición del cogollo de la piña (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar MD2 en Isla, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 104-115.

**Resumen.** La pudrición del cogollo de la piña (*Ananas comosus* L. Merrill) es una enfermedad con alta incidencia en la regiones productoras de Veracruz, México, el cultivar MD2 es el más susceptible. El objetivo de este estudio fue identificar morfológica y filogenéticamente el agente causal de la enfermedad. Muestras de piña se colectaron entre septiembre de 2011 y marzo de 2012. De las hojas basales en contacto con el cogollo con pudrición se aisló a *Phytophthora*. Se realizó la identificación morfológica y molecular utilizando los iniciadores ITS6 e ITS4. En la caracterización morfológica se identificó a *Phytophthora nicotianae*. La identificación molecular tuvo 100% de similaridad con *Phytophthora nicotianae*. Se realizaron pruebas de patogenicidad en coronas de piña *in vitro* en agua y vástagos (gallos) de 5 meses *in vivo* en suelo. Los síntomas en corona se presentaron a los 7 y 9 días

**Abstract.** The heart rot of pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) is a disease with a high incidence in the production areas of Veracruz, Mexico; the MD2 cultivar is the most susceptible. The objective of this study was to identify, morphologically and phylogenetically, the causative agent of the disease. Pineapple samples were collected between September 2011 and March 2012. *Phytophthora* was isolated from the basal leaves that came in contact with the heart that presented signs of rot. The morphological and molecular identification was done using the ITS6 and ITS4 initiators. *Phytophthora nicotianae* was identified in the morphological characterization. The molecular identification had a 100 % similarity with *Phytophthora nicotianae*. Pathogenicity tests were done on *in vitro* pineapple crowns in water and *in vivo* stems (roots) of 5 months in soil. Crown symptoms appeared on days 7 and 9 in 100% of the crowns and on days 16 to 20 in 95% of the inoculated stems. Based on the morphology, phylogenetics and pathogenicity test are considered the first report of *Phytophthora nicotianae* in pineapples in Mexico.

**Keywords:** Heart rot, *Ananas comosus*, *Phytophthora nicotianae*.

en 100 % de coronas y de 16-20 días en un 95 % de vástagos inoculados. En base a morfología, filogenia y prueba de patogenicidad se considera el primer reporte de *Phytophthora nicotianae* en piña en México.

**Palabras clave:** Pudrición del cogollo, *Ananas comosus*, *Phytophthora nicotianae*.

La piña (*Ananas comosus* L. Merrill) es nativa de las regiones tropicales y subtropicales de América del Sur, pertenece a la familia de las bromeliáceas, del orden Bromeliales y a la especie *Ananas comosus*.

Según estimaciones de la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), se calcula que para 2014 la producción mundial de frutas tropicales llegará a 82 millones de toneladas; el 78 % corresponde a las “frutas principales” (mango, piña, aguacate y papaya) y el 22 % a las “frutas secundarias” (litchi, rambután, guayaba y maracuyá). Los países en desarrollo representan alrededor del 98 % de la producción total, mientras que los países desarrollados representan el 80 % del comercio mundial de importaciones (FAOSTAT, 2013).

La producción de piña es de importancia económica para las zonas tropicales y subtropicales del mundo, es el segundo fruto tropical producido después del mango. Los principales productores de piña se encuentran en Asia-Pacífico (Tailandia, India, Filipinas, China, Vietnam y Malasia) con el 47 % de la producción mundial. En América Latina los principales productores son Brasil y Costa Rica, ocupando el segundo y tercer lugar a nivel mundial respectivamente; México ocupa el décimo lugar. En el año 2012 la superficie total cultivada con piña fue de aproximadamente 17 mil ha, con una producción total aproximada de 760 mil t, siendo los principales productores los estados de Veracruz, Oaxaca, Nayarit y Tabasco (FAOSTAT, 2013; SIAP, 2013).

The pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) is native to the tropical and subtropical regions of South America; it belongs to the Bromeliaceae, of the Bromeliales order and the *Ananas comosus* species.

The Food and Agriculture Organization (FAO) estimates that by 2014 the global production of tropical fruit will reach 82 million tons; 78 % corresponding to the “main fruits” (mango, pineapple, avocado and papaya) and 22 % to the “secondary fruits” (lychee, rambutan, guava, and passion fruit). Developing countries represent around 78 % of the total production, while the developed countries represent 80 % of the world trade (FAOSTAT, 2013).

The production of pineapple is financially relevant for the tropical and subtropical areas of the world; it is the second produced tropical fruit after the mango. The main pineapple producers are located in the Asia-Pacific (Thailand, India, Philippines, China, Vietnam and Malaysia) holding 47% of the global production. In Latin America the main producers are: Brazil and Costa Rica, ranking second and third place respectively on a global scale; Mexico ranks tenth. In 2012, the total area for pineapple cultivation was approximately 17 thousand hectares, with a total approximate production of 769 thousand tons, the main producers being the states of Veracruz, Oaxaca, Nayarit and Tabasco (FAOSTAT, 2013; SIAP, 2013).

The most cultivated crop in Mexico is the ‘Smooth Cayenne’ pineapple, occupying 80 % of the total cultivated surface (Rebolledo *et al.* 2006); in the last two decades, the main pineapple producers in the world, “Del Monte” and “Dole”, released a new cultivar, the MD2 hybrid (‘Gold Pineapplehoney’), created in Hawaii. The MD2 cultivar produces fruit with yellower pulp, sweeter and less acidic than other cultivars. It possesses a total of 15 to 17° soluble solids, while the ‘Smooth Cayenne’ possesses 12 to 15°; it also has a higher



El cultivar más sembrado en México es ‘Cayena Lisa’ con 80% de la superficie total sembrada (Rebolledo *et al.* 2006); en las últimas dos décadas “Del Monte” y “Dole”, las dos principales empresas productoras de piña en el mundo liberaron un nuevo cultivar, el híbrido MD2 (‘Piña miel’), originado en Hawai. El cultivar MD2 genera frutos con pulpa más amarilla, más dulce y con menor acidez que otros cultivares, posee de 15 a 17° de sólidos solubles totales, mientras que ‘Cayena Lisa’ tiene de 12 a 15° ; también cuenta con un mayor contenido de vitamina A y C, además de que el fruto adquiere una forma más cilíndrica y no con forma de botella, lo que facilita su manejo en su industrialización (FAOSTAT, 2013; Williams and Fleisch, 1992; Rebolledo *et al.*, 1998; Rebolledo *et al.*, 2011; Fold and Gough, 2008; Chan *et al.*, 2002; Morgan and Thompson, 2000).

El principal problema que enfrenta el cultivar MD2 en las zonas productoras de Veracruz es la pudrición del cogollo. Coppens *et al.* (1997) han reportado que esta enfermedad ha causado graves pérdidas económicas en Australia, Hawái, Filipinas, Sudáfrica y Tailandia. Rebolledo *et al.* (2011) mencionan que es causado por *Erwinia chrysanthemi* y Espinosa and Adam (1972), aluden esta enfermedad a *Phytophthora nicotianae*. El objetivo del presente estudio fue identificar al agente causal de la pudrición del cogollo de la piña para la localidad de Isla, Veracruz, México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sitio de estudio y muestreo.** El área de estudio se localizó en localidad en la Isla, Veracruz, México a 18° 8’ N y 95° 35’ O, 60 msnm de altitud, con clima cálido-húmedo, temperatura promedio de 24.9 °C y precipitación pluvial media anual de 2316 mm. De Septiembre de 2011 a Marzo de 2012

vitamin A and C content, while additionally having a more cylindrical shape and not bottle-like, which facilitates its handling during its industrialization (FAOSTAT, 2013; Williams and Fleisch, 1992; Rebolledo *et al.*, 1998; Rebolledo *et al.*, 2011; Fold and Gough, 2008; Chan *et al.*, 2002; Morgan and Thompson, 2000).

The main problem faced by the MD2 cultivar in the production regions of Veracruz is the heart rot of the pineapple. Coppens *et al.* (1997) have reported that this disease has caused severe financial losses in Australia, Hawaii, Philippines, South Africa and Thailand. Rebolledo *et al.* (2011) mention that it is caused by *Erwinia chrysanthemi* and Espinosa and Adam (1972), attribute this disease to *Phytophthora nicotianae*. The objective of this study is to identify the causative agent of the heart rot of the pineapple for the municipality of Isla, Veracruz, Mexico.

## MATERIALS AND METHODS

**Study site and sampling.** The study area was located in Isla, Veracruz, Mexico at 18° 8’ N y 95° 35’ O, 60 m above sea level, in warm-humid weather, average temperature of 24.9 °C and average annual rainfall of 2,316 mm. From September 2011 to March 2012, 40 plants with heart rot characteristic symptoms were collected and processed in the laboratory of post-harvest fruit diseases at the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de Mexico.

**Isolation.** The sick pineapple plants were washed under a stream of clean water to eliminate soil excess. 5 mm<sup>2</sup> pieces between healthy and sick tissue were cut in basal leaves. They were disinfested through immersion in a solution of 3 % Sodium Hypochlorite for 4 min., rinsing 4 times with distilled water and dried with sterile paper

se recolectaron 40 plantas con síntomas característicos de pudrición del cogollo y se procesaron en el Laboratorio de enfermedades de frutos en postcosecha del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México.

**Aislamiento.** Las plantas de piña enfermas se lavaron bajo el chorro de agua potable para eliminar exceso de tierra. En hojas basales, se cortaron trozos de 5 mm<sup>2</sup> entre tejido sano y enfermo, se desinfectó por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio 3 % durante 4 min, con 4 enjuagues con agua destilada estéril y se secaron con toallas de papel absorbente estéril. Un total de 600 fragmentos se sembraron en tres medios de cultivo: papadextrosa- agar (PDA), agar- nutritivo, V8- agar (pimaricina 10 µg/L, ampicilina 292 µg/L, rifampicina 10 µg/L, pentacloronitrobenzeno 0.10 g/L e himexazol 0.25 µg/L), con un total de 150 cajas sembradas. Todas las cajas de Petri se incubaron a 28 °C en luz blanca como lo recomiendan Jeffers and Martin, 1986 y Erwin and Ribeiro, 1996. Se realizó la purificación de aislamientos por punta de hifa, una vez purificadas se transfirieron a cajas de Petri con medio de cultivo V8- agar ( acidificado con ácido láctico al 25 %) para su caracterización.

Por otra parte, se cortaron 20 hojas basales de las plantas enfermas con pudrición, se desinfestaron como lo descrito para hojas basales, se colocaron en agua destilada estéril a 28 °C en luz blanca. Después del segundo día se observó crecimiento de micelio color blanquecino y de cada hoja se transfirió segmento de micelio en medio de cultivo jugo de verduras V8- acidificado.

**Preparación del inóculo.** A partir de aislamientos de *Phytophthora* en medio de cultivo PDA, se tomaron fragmentos que se colocaron en agua destilada estéril para formación de esporangios y liberación de zooporas. Con la cámara de Neubauer se

towels. A total of 600 fragments were cultivated in three culture mediums: potato- dextrose-agar (PDA), nutrient agar, V8- agar (Natamycin 10 µg/L, ampicillin 292 µg/L, rifampicin 10 µg/L, pentachloronitrobenzene 0.10 g/L and hymexazol 0.25 µg/L), with a total of 150 cultivated boxes. All Petri dishes were incubated at 28 °C in white light as recommended by Jeffers and Martin, 1986 and Erwin and Ribeiro, 1996. The purification of isolated samples\* was done through hyphal head, once purified they were transferred to Petri dishes with v8-agar culture mediums (acidified with lactic acid at 25 %) for their characterization.

Additionally, 20 basal leaves were cut from the rot diseased plants, they were disinfested as it was described for the basal leaves and they were placed in distilled water at 28°C in white light. After the second day, white colored mycelium growth was observed, and a segment of mycelium was transferred from each leaf in acidified vegetable juice V8 culture medium.

**Preparation of the inoculum.** From the *Phytophthora* isolates in PDA culture medium, fragments were taken and placed in distilled water for the formation of sporangiums and the release of zoospores. A suspension of zoospores was prepared with the Neubauer camera, with a concentration of 10<sup>8</sup> zoospores ml<sup>-1</sup> (Rodríguez *et al.* 2002).

**Pathogenicity tests.** *In vitro* pathogenicity tests were carried out in 60 crowns and 80 *in vivo* stems. Both materials were sun dried during 5 days and disinfected with 3 % sodium hypochlorite for 4 min. and were washed 4 times with distilled water. 4 lesions were inflicted in 60 crowns with a needle in the median stem of the crown, 30 of the crowns were placed in a recipient with 300 ml of

preparó una suspensión de zoosporas a una concentración de  $10^8$  zoosporas  $\text{ml}^{-1}$  (Rodríguez *et al.*, 2002).

**Pruebas de patogenicidad.** Se realizaron pruebas de patogenicidad *in vitro* en 60 coronas y 80 vástagos *in vivo*, ambos materiales se secaron a la luz solar durante 5 días y se desinfectaron con hipoclorito de sodio 3 % por 4 min y se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril. En las 60 coronas se realizaron 4 lesiones con aguja en el tallo medio de la corona, 30 de las coronas se colocaron en recipiente con 300 ml de la suspensión de esporas, 30 coronas se utilizaron como testigos y solamente se le adicionó agua destilada estéril sin zoosporas. El tratamiento se colocó en luz blanca a 28 °C hasta la aparición de síntomas. Para las pruebas *in vivo* se utilizaron vástagos de 5 meses de edad sembrados en bolsas de polietileno en una mezcla de tierra y tezontle (3:2 v/v). En 40 vástagos se removió la tierra 8 cm alrededor del cogollo, se les hicieron cuatro lesiones con una aguja esterilizada en el tallo medio y se agregaron 300 ml del inóculo junto con fragmentos de micelio con esporangios y se cubrió de nuevo con la tierra removida, a los 40 testigos se realizó la misma técnica, pero solo se utilizó agua destilada estéril. A las plantas se les colocó otra bolsa de polietileno hasta la aparición de síntomas. En ambos tratamientos el tejido dañado se sembró en medio de cultivo V8- agar acidificado.

**Caracterización morfológica.** Se caracterizó en base a crecimiento micelial, pigmentación y formación de estructuras de reproducción de la colonia creciendo en PDA y bajo luz blanca continua a 28 °C. La identificación del género se hizo con las claves de Erwin and Ribeiro (1996), y para especie con las descritas por Gallegly and Hong (2008).

the suspension of spores, 30 crowns were used as controls and were only added sterile water without zoospores. The treatment was placed under white light at 28°C until the appearance of symptoms. For the *in vivo* tests, 5 month old stems were used, cultivated in polyethylene bags in mixtures of soil and tezontle (3:2 v/v). In 40 stems, the soil was removed at about 8 cm around the heart of the pineapple, 4 lesions were inflicted on the median stem with the sterilized needle and 300 ml of inoculum were added along with mycelium fragments with sporangiums and was covered again with the removed soil. The same technique was applied to the 40 control samples, but only distilled water was used. Another polyethylene bag was placed on the other plants until the appearance of symptoms. For both treatments the damaged tissue was cultivated in acidified V8-agar culture.

**Morphological characterization.** It was characterized based on the mycelial growth, pigmentation and formation of reproduction structures of the colony growing in PDA and under perpetual white light at 28°C. The identification of the genus was done through the Erwin and Ribeiro (1996) key, and for the species with the ones described by Gallegly and Hong (2008).

**Molecular Identification.** The extraction of DNA was done from a 6 day growth cultivar in a V8 liquid medium at 28 °C, using the CTAB protocol (Doyle and Doyle 1990). The transcribed internal space of the ribosomal DNA was amplified using the ITS6 and ITS4 initiators (White *et al.* 1990). The sequences obtained were compared with the database in the National Center for Biotechnology Information NCBI (2012), USA ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

**Identificación molecular.** La extracción del ADN se hizo a partir de un cultivo de 6 días de crecimiento en medio líquido V8 a 28 °C, utilizando el protocolo de CTAB (Doyle and Doyle, 1990). El espacio transcrito interno del ADN ribosomal se amplificó utilizando los iniciadores ITS6 e ITS4 (White *et al.*, 1990). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del Banco de Genes del centro NCBI (2012), USA (www.ncbi.nlm.nih.gov).

## RESULTADOS

**Aislamiento de microorganismos.** En los diferentes medios se observó que en el medio de cultivo V8 – agar con antibiótico, se aisló con mayor frecuencia a *Phytophthora* sp. y en menor frecuencia en agar-nutritivo y PDA. En medio de cultivo agar nutritivo y PDA se aisló con mayor frecuencia a *Pythium*, los porcentajes se muestran en el Cuadro 1.

De las 20 hojas colocadas en frascos con agua destilada estéril, a los 2 días se observó el crecimiento de micelio (Figura 1) y en los fragmentos sembrados en PDA y V8-agar acidificado se desarrollaron colonias características de *Phytophthora* sp.

**Pruebas de patogenicidad.** En las pruebas *in vitro*, los síntomas mostraron un color verde pálido, puntas de hojas necrosadas a los 7-9 días. Además se observó hojas centrales podridas y en el centro de la roseta había una coloración café tenue y micelio de *Phytophthora* (Figura 2), el 100 % de las coronas inoculadas se enfermaron. Los testigos no presentaron síntomas ni signos y desarrollaron un sistema radical abundante. A partir del tejido necrosado, se realizaron nuevamente aislamientos en medio V8-Agar acidificado de donde se aisló a *Phytophthora nicotianae*. Para las pruebas *in vivo*

## RESULTS

**Isolation of microorganisms.** It was observed among the different mediums that in the V8 agar with antibiotic culture medium, *Phytophthora* sp. was isolated with more frequency, and less frequently in the nutrient and PDA agars. In the nutrient and PDA agars, *Pythium* was isolated with more frequency, the percentages are shown in Table 1.

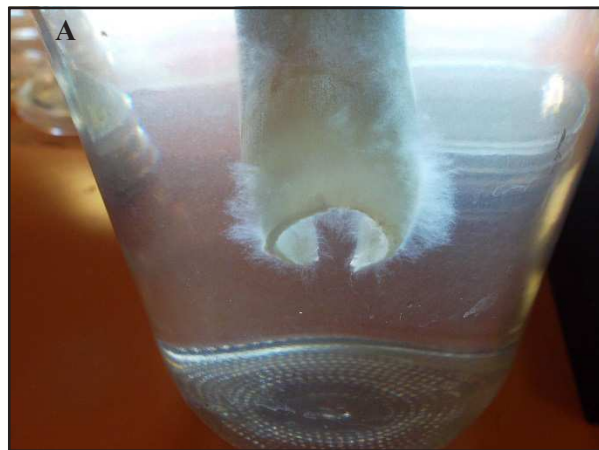
From the 20 leaves placed in flasks with distilled water, the growth of mycelium was observed after 2 days (Figure 1), and the fragments cultivated in PDA and acidified V8- agar developed colonies characteristic of *Phytophthora* sp.

**Pathogenicity tests.** In the *in vitro* tests, the symptoms presented a pale green color and necrosis on the tips of the leaves within 7 to 9 days. Furthermore, rotten middle leaves presented a light brown color in the middle of the rosette, and *Phytophthora* mycelium could also be observed (Figure 2). 100 % of the inoculated crowns got the disease. The control samples did not present any symptoms or signs and developed an abundant radical system. From the necrotic tissue, isolation was once again performed in acidified V8- Agar wherein *Phytophthora nicotianae* was isolated. For the *in vivo* tests, the symptoms and signs took 16 days to manifest, starting with a change in the color of the leaves to a lighter green, the tips of which were necrotic around the heart of the pineapple. Within 20 days, heart rot was evident, the center of the rosette was brown and mycelium was present, the base of the middle leaves had a putrid smell; 38 (95%) of the 40 inoculated plants showed symptoms of the sickness. The control samples did not present symptoms or signs of the disease. From the necrotic leaves isolations were performed in acidified V8- agar culture medium,

**Cuadro 1.** Porcentaje de microorganismos aislados de plantas de piña (*Ananascomosus* L. Merrill) cultivar MD-2 con signos y síntomas de pudrición del cogollo. Isla, Veracruz, México, Verano del 2011.

**Table 1.** Percentage of isolated microorganisms in pineapple plants (*Ananascomosus* L. Merrill) MD2 cultivar with signs and symptoms of heart rot. Isla, Veracruz, Summer, 2011.

| Medio de cultivo  | Oomicetes                |                     | Bacterias y hongos saprófitos |
|-------------------|--------------------------|---------------------|-------------------------------|
|                   | <i>Phytophthora</i> spp. | <i>Pythium</i> spp. |                               |
| V8 + Antibióticos | 180/200 (90 %)           | 0/200 (0 %)         | 0/200 (0 %)                   |
| Agar Nutritivo    | 48/200 (24 %)            | 22/200 (11 %)       | 10/200 (55 %)                 |
| PDA               | 11/200 (5.5 %)           | 45/200 (22.5 %)     | 22/200 (11 %)                 |



**Figura 1.** A) y B) Micelio de *Phytophthora* sp. desarrollado a dos días en agua destilada estéril, en hojas basales de piña colectadas en campo.

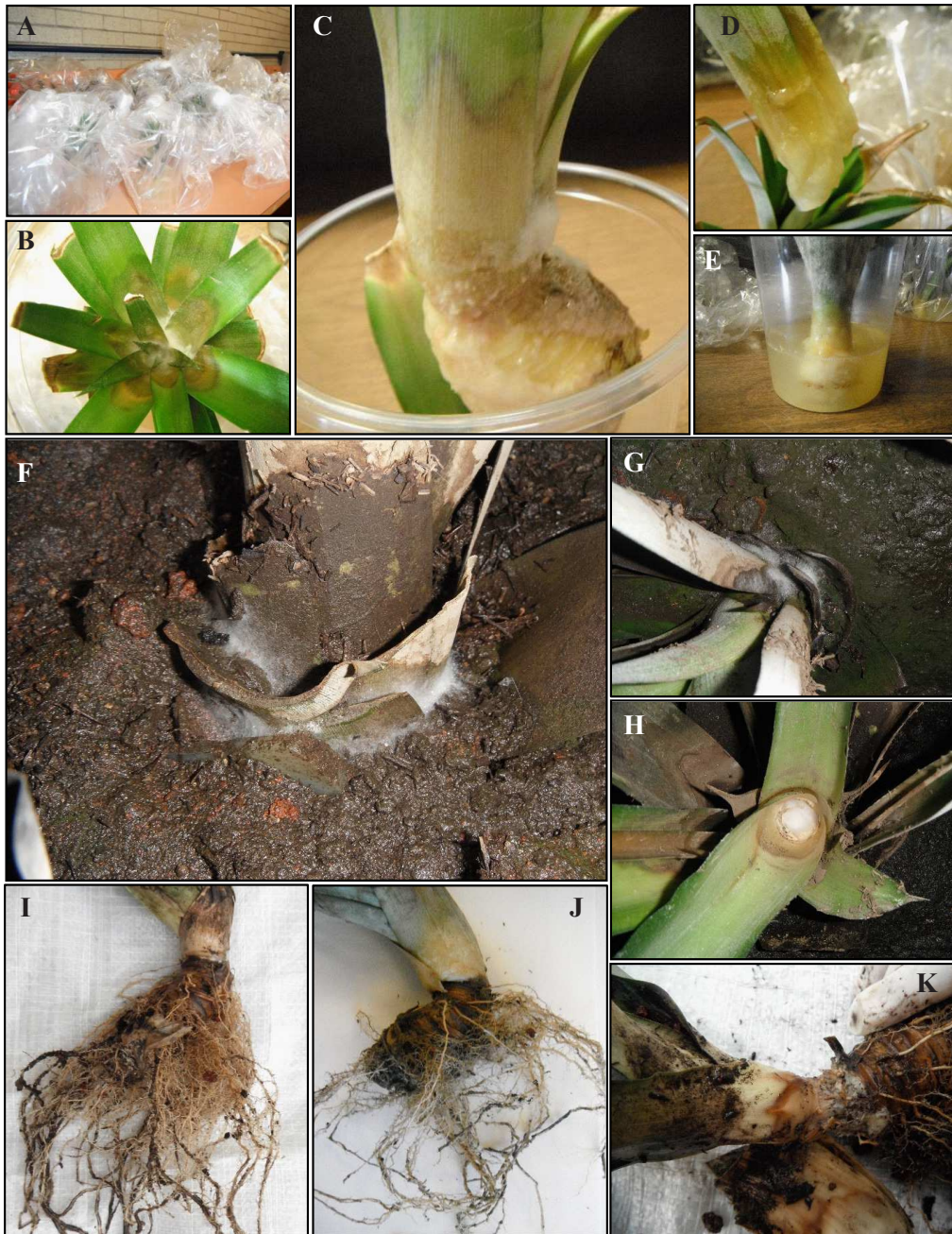
**Figure 1.** A) and B) *Phytophthora* sp. Mycelium grown in distilled water for two days, in basal leaves collected from the field.

los síntomas y signos tardaron 16 días en manifestarse, iniciando con un cambio en la coloración de las hojas a verde más claro, las puntas de estas se necrosaron alrededor del cogollo. A los 20 días la pudrición del cogollo era evidente, el centro de la roseta mostró una coloración café y micelio, la base de las hojas centrales con olor putrefacto; 38 (95 %) de las 40 plantas inoculadas mostraron síntomas de la enfermedad. Los testigos no presentaron síntomas ni signos de la enfermedad. De las hojas necrosadas se hicieron aislamientos en medio

where the presence of *Phytophthora nicotianae* was corroborated.

**Morphological characterization.** The growth of mycelial hyaline was carried out in a V8- agar culture medium, non-defunct, spherical and/or limoniform sporangiums with a prominent papilla, the average size of 100 sporangiums was 44.6 x 36.8 µm; spherical, non-papillate chlamydo spores were present, terminal and intercalated hyalines of 30.2 µm (average of 100 chlamydo spores) (Figure





**Figura 2.** Síntomas y signos de la pudrición del cogollo de la piña. A) Pruebas *in vitro* de la pudrición del cogollo de la piña. B) Signos y síntomas en coronas inoculadas. C) Pudrición del cogollo. D) Hoja de corona con pudrición. E) Corona de piña 9 ddi. F) Signos del oomiceto en plantas inoculadas. G) Signos y síntomas en plantas inoculadas en invernadero. H) Cogollo podrido de la planta de piña. I) Cogollo y raíz de planta testigo de prueba *in vivo*. J) Cogollo y raíz de planta inoculada. K) Planta de piña 16 ddi.

**Figure 2.** Symptoms and signs of heart rot of the pineapple. A) *In vitro* tests of the heart rot of the pineapple. B) Signs and symptoms in inoculated crowns. C) Heart Rot. D) Crown leaf with rot. E) Pineapple crown 9 ddi. F) Signs of the oomycete in inoculated plants. G) Signs and symptoms in inoculated plants in greenhouses. H) Rotten heart of the pineapple plant. I) Heart and root *in vivo* of the control plant. J) Heart and root of the inoculated plant. K) Pineapple plant 16 ddi.

V8-agar acidificado, donde se corroboró la presencia de *Phytophthora nicotianae*.

**Caracterización morfológica.** En medio de cultivo V8-agar se desarrollo crecimiento micelial hialino, esporangios no caducos, esféricos a limoniformes con una papila prominente, el tamaño promedio de 100 esporangios fue de  $44.6 \times 36.8 \mu\text{m}$ ; se presentaron clamidosporas esféricas, no papiladas, hialinas terminales e intercalares de  $30.2 \mu\text{m}$  (promedio de 100 clamidosporas) (Figura 3). La formación de esporangios en agua destilada estéril se presentó a

3). The formation of sporangiums in distilled water appeared within 48 hrs. under perpetual white light. The characteristics coincide with those reported by Erwin and Ribeiro (1996) and Gallegly and Hong (2008) for *Phytophthora nicotianae*.

**Molecular identification.** The product of amplification that was obtained with the ITS4 and ITS6 initiators was of 850 bp (fig. 3). The comparison of the nucleotide sequence of the isolate showed 100% similarity with the *Phytophthora nicotianae* sequence.



**Figura 3.** Estructuras asexuales de *Phytophthoranicotianae*. A) Esporangio esférico. B) Esporangio limoniforme. C) Esporangio ovoide. D) Clamidospora intercalar. E) Clamidospora terminal.

**Figure 3.** Asexual structures of *Phytophthoranicotianae*. A) Spherical Sporangium. B) Limoniform Sporangium. C) Ovoid Sporangium. D) Interspersed Chlamydospore. E) Terminal Chlamydospore.

las 48 hs. en exposición continua bajo luz blanca. Las características coinciden con las reportadas por Erwin and Ribeiro(1996) y Gallegly and Hong (2008) para *Phytophthora nicotianae*.

**Identificación molecular.** El producto de amplificación que se obtuvo con los iniciadores ITS4 e ITS6 fue de 850 bp (fig 3). La comparación de la secuencia de nucleótidos del aislamiento mostró 100% de similitud con la secuencia de *Phytophthora nicotianae*.

## DISCUSIÓN

Los resultados de pudrición del cogollo *in vivo* e *in vitro* similares a los observados en los campos de cultivo de Isla, Veracruz, que inician con lesiones acuosas en la base de las hojas (tejido sin clorofila) y el cogollo, las hojas se tornan a un verde más claro, las puntas de estas se necrosan y desarrollan un olor fétido característico es causado por *Phytophthora nicotianae* y coincide con lo descrito por Espinosa y Adam (1972) en México y por Joy y Sindhu (2012) en la India respectivamente. Estos síntomas probablemente se deban a la obstrucción física del sistema vascular causado por el crecimiento de hifas y a la penetración de otros organismos secundarios (hongos y bacterias), aumentando la formación de gomas que se originan por la oxidación y acumulación de los residuos de la degradación celular, como sucede en plantas ornamentales (Arévalo-Galarza, 2012; Agrios, 2005). Posterior a la inoculación y a la formación de zoosporas, éstas son atraídas a la zona de elongación y diferenciación de la raíz, en donde forman quistes, e inclusive invaden a las raíces secundarias y no a las puntas(Galiana *et al.*, 2005; Attard *et al.*, 2010).La mayor incidencia

## DISCUSSION

The *in vivo* and *in vitro* heart rot results similar to those observed in the cultivation fields of Isla, Veracruz, that start with aqueous lesions at the base of the leaves (tissue without chlorophyll) and the heart of the fruit, the leaves turn a lighter green, the tips become necrotic and develop a characteristic putrid smell, all caused by *Phytophthora nicotianae*, coinciding with the description by Espinosa and Adam (1972) in Mexico and by Joy and Sindhu (2012) in India. These symptoms are probably present due to the physical obstruction of the vascular system caused by the growth of hyphae and the penetration of other secondary organisms (fungi and bacteria), increasing the formation of gums that originate due to oxidation and the accumulation of cellular degradation residues, as happens with ornamental plants (Arévalo-Galarza, 2012; Agrios, 2005). Subsequent to inoculation and the formation of zoospores, these are attracted to the elongation zone and differentiation of the root, where they form cysts, and even invade the secondary roots and not the tips (Galiana *et al.*, 2005; Attard *et al.*, 2010). Most cases of heart rot in pineapples in the sampling areas were observed during the rainy season, with temperatures that oscillated between 24-26 °C and a relative humidity of 90-100 %; the high relative humidity induces the development of the diseases caused by *Phytophthora* sp. in pineapple plantations (Duniway, 1983).

Additionally, when cultivating in slope areas, cultural labors (fertilization, weed control, soil removal, etc.) and lesions caused by other organisms (nematodes and rodents) to the radical system, facilitate the dispersion and the infection risk by *Phytophthora* sp. as mentioned by Erwin and Ribeiro, 1996, Elliot, 1989, Jung and Blaschke, 2004 and; Galiana *et al.*, 2005.



de pudrición del cogollo de la piña en el área de muestreo se observó en la temporada de lluvia, con temperaturas que oscilan entre 24 - 26 °C y una humedad relativa del 90 -100 %; la alta humedad relativa induce el desarrollo de las enfermedades causadas por *Phytophthora* sp. en el cultivo de piña (Duniway, 1983).

Adicionalmente al sembrar en áreas con pendiente, labores culturales (fertilización, control de malezas, remoción del suelo, etc.) y lesiones causadas por otros organismos (nematodos y roedores) al sistema radical, facilitan la dispersión y el riesgo de infección por *Phytophthora* sp. como lo mencionan Erwin y Ribeiro, 1996, Elliott, 1989 Jung y Blaschke, 2004y ; Galiana *et al.*, 2005.

## CONCLUSIÓN

Las pruebas de patogenicidad, así como la identificación morfológica y caracterización molecular, confirmaron que *Phytophthora nicotianae* es el agente causal de la pudrición del cogollo de la piña en la localidad de Isla, Veracruz, México.

## LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5a Ed. Elsevier Academic Press. New York. 922 p.
- Arévalo-Galarza, L., García-Osorio, C. y Rosas-Saito, G.H. 2012. Factores que afectan la vida de florero en flores de corte. Agroproductividad 5 (3):28-35.
- Attard, A., Gourgues, M., Callemeyn-Torre N., and Keller, H. 2010. The immediate activation of defense responses in Arabidopsis roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. New Phytologist 187 (2): 449-460
- Chan, Y. K., Coppens, d'Eeckenbrugge G, Sanewski, G. M. 2002. Breeding and variety improvement. P. 33-35 In: Bartholomew, D.P., Paull, R.E., Rohrbach, K.G. (eds.) The pineapple, botany, production and uses. CABI Publishing, New York.

## CONCLUSION

Pathogenicity tests, as well as morphological identification and molecular characterization, confirmed that *Phytophthora nicotianae* is the causative agent of heart rot in pineapple in the municipality of Isla, Veracruz, Mexico.

~~~~~ Finaliza la versión en Inglés ~~~~~

- Coppens, G., Leal, F., Duval, M. F. Germplasm resources of pineapple. 1997. Hort.Rev., 21:133-175.
- Doyle, J. J. and Doyle J. L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus 12:13-15.
- Duniway, J. M. 1983. Role of physical factors in the development of *Phytophthora* diseases. p. 175-187 In: *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P. H. Tsao (eds.) American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Elliott, C. G. 1989. Some aspects of nitrogen nutrition and reproduction in *Phytophthora*. Mycol. Res. 92 (1): 34-44
- Erwin, D and Ribeiro, O. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathol. Soc., MN., p. 9-14
- Espinosa, R. G. and Adam, A. V. 1972. Major diseases of pineapple in Oaxaca, México, and their control. FAO Plant Protect. Bull. 20 (4): 79-87
- FAOSTAT, 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Consultado Enero 2013. <http://faostat.fao.org>
- Fold N. and Gough K. V. 2008. From smallholders to transnationals: The impact of changing consumer preferences in the EU on Ghana's pineapple sector. Geoforum. 39 (5): 1687-1697
- Galiana, E., Rivière, M.-P., Pagnotta, S., Baudouin, E., Panabières, F., Gounon, P., and Boudier, L. 2005. Plant-induced cell death in the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. Cellular Microbiol. 7 (9), 1365-1378
- Galleghy, E. M. and Hong, C. 2008. Identifying species by morphology and DNA fingerprints. The American Phytopathol. Soc. St. Paul MN. U.S.A. 108 p.
- Hassan, A., Othman, Z., and Siriphanich, J. 2011. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) p. 194-212 In: Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits. Vol. 4 Mangosteen to white soppote. Elhadi M. Yahia (ed.) Woodhead Publishing. UK.
- Jeffers, S. N. and Martin, S. B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. Plant Dis. 70:1038-1043.
- Joy P. P. and Sindhu G. 2012. Diseases of pineapple (*Ananas comosus*): Pathogen, symptoms, infection, spread & management. Consultado Agosto 2013. <http://www.kau.edu/prsvkm/Docs/DiseasesofPineapple.pdf>

- Jung, T. and Blaschke, M. 2004. *Phytophthora* root and collar of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plan Pathol.* 53: 193-208
- Kaneshiro, W. S., Burger, M., Vine, B., de Silva, A. S. and Alvarez, M. 2008. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* from a bacterial heart rot of pineapple outbreak in Hawaii. 2008. *Plant Dis.*, 92 (10): 1444-1450.
- Mircetich S. M., and Browne G. T. 1987. *Phytophthora* root and crown rot of deciduous fruit trees: Progress and problems in etiology, epidemiology and control. *Commemorative Symp.* 111 p.
- Morgan, T., and Thompson, T. 2000. Del Monte mixes and matches Costa Rican products. *Americafruit* 3: 45-47
- NCBI. 2012. National Center for Biotechnology Information. Gen Bank. Consultado Julio 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Ochse, J. J., Soule, M. J., JR., Dijkman, M. J. y Wehlburg, C.. 1965. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Editorial Limusa – Willey S. A., México, D. F. pp. 639-643
- Peckham G. D., Kaneshiro, W. S., Luu V., Berestecky, J. M., and Alvarez A. M.. 2010. Specificity of monoclonal antibodies to strains of *dickeya* sp. that cause bacterial heart rot of pineapple. *Hybridoma* 29(5): 383-389.
- Py, C. and Tisseau, M.. 1969. La piña tropical. Ed. Blumé. Barcelona, España. 278 p
- Rebolledo, M. A., Del Ángel P. A. L., Rebolledo, M. L. y Becerril, R. A. E., Uriza, A. D. 2006. Rendimiento y calidad de fruto de cultivares de piña en densidades de plantación. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 29 (1): 55-62
- Rebolledo, M. A., Uriza, A.D.E., Pérez, A. del A., Rebolledo, L. M. y Zetina, L. R.. 2011. La piña y su cultivo en México: Cayena Lisa y MD2. Campo Experimental Cotaxtla, Veracruz, México. Libro Técnico No. 27 306 p.
- Rebolledo, M. L., Uriza, A.D.E., Rodríguez, J. G. y Rebolledo, M. A. 1998. Tecnología para la producción de piña en México. Libro técnico No. 20. SAGARPA. INIFAP. CIR-GOC. Campo Exptl. Papaloapan. Veracruz, México 159 p.
- Rodríguez, Y., Mosqueda, M., Companioni, B., Arzola, M., Borrás, O., Perez, M. C., Lorenzo, J. C., and Santos, R. 2002. Bioassay for *in vitro* differentiation of pineapple cultivar resistance levels to heart rot disease. *In vitro Cell. Dev. Boil.-Plant* 38:613-616.
- SIAP, 2013. Servicio de Información Agroalimentario y Pesquero. Consultado Enero 2013. <http://www.siap.gob.mx>
- White, T. J., Lee, B. S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315 – 322. In: Innis, M. A., Gelfand, D. A., Sninsky, J. J., White, T. J. (eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, CA, U.S.A.
- Williams, D. D. F., and Fleisch H. 1992. Historical review of pineapple breeding in Hawaii. *Acta Horticulturae.* 334: 67-76